

N° D'ORDRE 98.

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LYON
(Chimie industrielle)

PAR

MARCEL SEUX

Ingenieur-Chimiste E. C. I. L.

PREMIÈRE THÈSE

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA FERMENTATION
DES LIQUEURS TANNIQUES

DEUXIÈME THÈSE

CAOUTCHOUCS SYNTHÉTIQUES ET FACTICES

Soutenues le 3 juillet 1939, devant la Commission d'Examen

MM. L. MEUNIER, *Président*,
VANEY, *Examinateur*.
CHAMBARD, —

LYON
IMPRIMERIE NOIRCLERC & FÉNÉTRIER
3, rue Stella, 3

1939

N° D'ORDRE 98.

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LYON
(Chimie industrielle)

PAR

MARCEL SEUX

Ingénieur-Chimiste E. C. I. L.

PREMIÈRE THÈSE

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA FERMENTATION
DES LIQUEURS TANNIQUES

DEUXIÈME THÈSE

CAOUTCHOUCS SYNTHÉTIQUES ET FACTICES

Soutenues le 3 juillet 1939, devant la Commission d'Examen

MM. L. MEUNIER, *Président*,
VANÉY, *Examinateur*.
CHAMBARD, —

LYON
IMPRIMERIE NOIRCLERC & FÉNÉTRIER
3, rue Stella, 3

1939

UNIVERSITÉ DE LYON -- FACULTÉ DES SCIENCES

Doyen

M. DOUIN, *, $\bar{\bar{I}}$, $\bar{\bar{I}}$.

Assesseur

M. VANEY, *, $\bar{\bar{I}}$, $\bar{\bar{I}}$.

Doyen honoraire

M. LONGCHAMBON, *, $\bar{\bar{I}}$, $\bar{\bar{I}}$, $\bar{\bar{I}}$.

Professeurs honoraires

MM. VESSIOT, C. *, $\bar{\bar{I}}$, $\bar{\bar{I}}$.

RIGOLLOT, *, $\bar{\bar{I}}$, $\bar{\bar{I}}$.

COUTURIER, *, $\bar{\bar{I}}$, $\bar{\bar{I}}$, $\bar{\bar{I}}$.

Professeurs

MM. DULAC, *, $\bar{\bar{I}}$, $\bar{\bar{I}}$, *Calcul différentiel et intégral.*

DOUIN, *, $\bar{\bar{I}}$, $\bar{\bar{I}}$, *Botanique.*

MEUNIER, O. *, $\bar{\bar{I}}$, $\bar{\bar{I}}$, *Chimie industrielle.*

SIRE, *, $\bar{\bar{I}}$, $\bar{\bar{I}}$, *Mécanique rationnelle et appliquée.*

VANEY, *, $\bar{\bar{I}}$, $\bar{\bar{I}}$, *Zoologie.*

CARDOT, *, $\bar{\bar{I}}$, $\bar{\bar{I}}$, *Physiologie générale.*

ROMAN, *, $\bar{\bar{I}}$, $\bar{\bar{I}}$, *Géologie.*

LOCQUIN, *, $\bar{\bar{I}}$, $\bar{\bar{I}}$, *Chimie générale.*

LONGCHAMBON, *, $\bar{\bar{I}}$, $\bar{\bar{I}}$, $\bar{\bar{I}}$, *Minéralogie.*

DÉJARDIN, *, $\bar{\bar{I}}$, $\bar{\bar{I}}$, *Physique générale.*

SOLLAUD, $\bar{\bar{I}}$, $\bar{\bar{I}}$, *Zoologie.*

THIBAUD, $\bar{\bar{I}}$, $\bar{\bar{I}}$, *Physique expérimentale.*

LEMARCHANDS, *, $\bar{\bar{I}}$, $\bar{\bar{I}}$, *Chimie appliquée.*

EYRAUD, $\bar{\bar{I}}$, $\bar{\bar{I}}$, *Mathématiques.*

FROMAGEOT, $\bar{\bar{I}}$, $\bar{\bar{I}}$, *Chimie biologique.*

AUMÉRAS, $\bar{\bar{I}}$, $\bar{\bar{I}}$, *Chimie physique.*

Maîtres de Conférences et chargés de Cours

MM. DŒUVRE, $\bar{\bar{I}}$, $\bar{\bar{I}}$, *Chimie organique.*

PRETTRE, *Chimie.*

Maître de Conférences adjoint

M. BONNET, *, $\bar{\bar{I}}$, $\bar{\bar{I}}$, *Zoologie générale et agricole.*

Chargés de Cours complémentaires

M^{lle} BACHRACH, $\bar{\bar{I}}$, $\bar{\bar{I}}$, *Physiologie.*

MM. DUFAY, $\bar{\bar{I}}$, $\bar{\bar{I}}$, *Astronomie et Physique supérieure.*

VIRET, $\bar{\bar{I}}$, $\bar{\bar{I}}$, *Etude des roches.*

RANSON, *Géométrie supérieure.*

KUHNER, *Botanique.*

LAVAL, *Minéralogie.*

TRONCHET, $\bar{\bar{I}}$, $\bar{\bar{I}}$, *Botanique.*

MAYET, *, $\bar{\bar{I}}$, $\bar{\bar{I}}$, $\bar{\bar{I}}$, *Anthropologie.*

PELOSSE, $\bar{\bar{I}}$, $\bar{\bar{I}}$, *Sériciculture.*

DARESTE DE LA CHAVANNE, $\bar{\bar{I}}$, $\bar{\bar{I}}$, *Géographie physique.*

SEYEWETZ, *, $\bar{\bar{I}}$, $\bar{\bar{I}}$, *Matières colorantes artificielles.*

Secrétaire

M. ROUX, $\bar{\bar{I}}$, $\bar{\bar{I}}$.



A MA MÈRE
A MON PÈRE

Témoignage de vive affection.

A MA FEMME

Collaboratrice de cette étude,
en faible témoignage de mon
profond amour.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

A MONSIEUR LE PROFESSEUR L. MEUNIER

*Professeur de Chimie Industrielle à la Faculté
des Sciences de l'Université de Lyon*

*Directeur de l'Ecole de Chimie Industrielle
et de l'Ecole Française de Tannerie*

Officier de la Légion d'Honneur

Hommage de profond respect
et de vive reconnaissance.

Contribution à l'Etude de la Fermentation des Liqueurs Tanniques

INTRODUCTION

Les jus tannants que l'on obtient en épuisant par l'eau des matières tannantes végétales, constituent des milieux de culture favorables au développement de certains microorganismes donnant lieu à différentes sortes de fermentations. (1) Ces jus renferment, en effet, en dehors du tanin proprement dit, des substances sucrées, des hydrates de carbone, des matières albuminoïdes, minérales, etc... La teneur en chacun de ces constituants varie très sensiblement avec la matière végétale d'origine (écorce de chêne, bois de châtaignier, etc...) et, si l'on tient compte, en outre, des hasards de l'ensemencement microbien, des conditions de température, d'acidité, d'aération, susceptibles de favoriser la pousse de telle ou telle espèce, on prévoit que la fermentation des jus tannants doit donner lieu à des phénomènes nombreux et assez complexes.

Une cuve de basserie abandonnée au repos pendant quelques jours se recouvre, tout d'abord, d'un voile

(1) L. MEUNIER et C. VANEY, *La Tannerie*, T. I., p. 382, Gauthier-Villars, édit., Paris, 1936.

léger présentant certaines analogies avec le voile de la « fleur du vin » ou de la bière. Plus tard, il se forme des îlots blanchâtres. Le voile est constitué par des *Mycodermes* à forme de levures, tandis que les îlots et la couche duveteuse, à laquelle ils donnent naissance, sont formés par des moisissures. Au bout de quelque temps, on voit apparaître des spores dans le mycélium, et désormais chaque sorte de moisissure se montre avec ses caractères morphologiques particuliers. On reconnaît ainsi la présence de la *moisissure blanche*, de *l'Aspergillus niger*, du *Penicillium glaucum*, etc... D'autre part, au-dessous de ce voile superficiel, la jusée elle-même devient le siège d'une abondante fermentation.

Ces fermentations peuvent influencer sur la marche du tannage, en raison même des modifications qu'elles apportent à la composition du milieu. De plus, dans certains cas, comme par exemple dans le dédoublement des tanins pyrogalliques par les moisissures, les phénomènes de fermentation entraînent une perte notable de tanin.

La fermentation des jus est donc importante en tannerie, et il serait intéressant de pouvoir isoler et identifier les microorganismes qui en sont la cause, de préciser leurs conditions d'existence, de connaître enfin les modifications qu'ils sont capables de déterminer dans le milieu. Cet ensemble de connaissances faciliterait le contrôle de la marche du tannage et permettrait, en outre, d'intervenir dans le mécanisme des phénomènes, de façon à entraver les fermentations nuisibles et à laisser se développer normalement celles qui sont favorables à la réalisation d'un bon tannage.

Bien que l'étude des bactéries et des levures présentant un caractère industriel ait fait l'objet, à l'heure actuelle, de nombreux travaux, nous ne possédons encore que peu de renseignements en ce qui concerne le cas particulier des microorganismes de la fermentation des tanins végétaux. C'est dans l'espoir d'apporter une modeste contribution à cette étude que nous avons entrepris nos recherches.

M. L. MEUNIER, Professeur à la Faculté des Sciences de Lyon et Directeur de l'Institut de Chimie, et le Docteur P. CHAMBARD, Professeur à l'Ecole Française de Tannerie, ont bien voulu accepter de conduire nos travaux. Nous sommes heureux de leur adresser nos très respectueux et bien sincères remerciements pour les conseils éclairés qu'ils nous ont prodigués au cours de cette étude.

Nous remercions également le Docteur GASTELLU qui nous a apporté une aide précieuse dans la rédaction de ce manuscrit.

Notre travail de recherche a été effectué, en grande partie, à Saint-Etienne (Loire), dans un laboratoire privé, et dans le Laboratoire municipal de cette ville que son distingué Directeur, M. COLOMBIER, a eu l'extrême obligeance de mettre à notre disposition. Nous lui exprimons, ici, ainsi qu'à M. CLAIR, son dévoué collaborateur, notre très vive gratitude.

Le présent travail comporte deux parties et cinq chapitres :

PREMIÈRE PARTIE. — Historique et Bibliographie.

DEUXIÈME PARTIE. — Etude expérimentale.

CHAPITRE PREMIER. — *Séparation et caractérisation de levures ou autres microorganismes à forme levurienne végétant sur les jus tannants.*

CHAPITRE II. — *Influence de la composition du milieu sur le développement des microorganismes.*

CHAPITRE III. — *Action du tanin sur les microorganismes des jusées.*

CHAPITRE IV. — *Action du tanin et du sucre.*

CHAPITRE V. — *Produits engendrés par la fermentation du glucose.*

CONCLUSIONS.

PREMIÈRE PARTIE

Historique et Exposé Bibliographique

Les premières notions sur la fermentation des matières tannantes datent de la seconde moitié du XVIII^e siècle, mais elles ne sont réellement précisées que vers 1900.

Le chimiste SCHEELE fut l'un des premiers à décrire, en 1786, l'altération des noix de Galle avec formation d'acide gallique. Il attribue ce dédoublement au phénomène naturel de la putréfaction, alors qu'en 1781, STAHL admettait que ce phénomène était dû à un ébranlement de la matière.

Ultérieurement, en 1833, PELOUZE constatant que ce dédoublement n'avait lieu qu'en présence de l'air le considéra comme le résultat d'une oxydation. A peu près à cette même époque, ROBIQUET fit observer que l'altération des noix de Galle provenait, non pas d'une oxydation, mais d'une fermentation, STRECKER, (1) en 1854, émit l'hypothèse que certaines levures dédoublent le tanin pur en glucose et acide gallique et transforment ensuite le glucose en alcool. Cette hypothèse fut immédiatement infirmée par VAN TIEGHEN (2) dont les travaux tendaient à prouver qu'une culture de levure pure dépérit rapidement dans un milieu renfermant du tanin.

(1) STRECKER, *Annalen*, 1854, 90, p. 328.

(2) VAN TIEGHEN, *Ann. Sc. Nat. Botanique*, 1868, Ann. 90.

D'après VAN TIEGHEN, ce sont des champignons inférieurs du genre des moisissures qui effectuent l'hydrolyse du tanin pyrogallique avec formation d'acide gallique. Ces moisissures accompagnent ordinairement les levures dans les matières tannantes végétales, mais, si l'on parvient à les supprimer, les levures pures demeurent sans action.

En 1894, HAENLEIN (1), étudiant les agents de fermentation des jus tannants préparés à partir de l'écorce de pin, identifiait le *Bacillus corticalis* et admettait que ce microorganisme était l'agent de l'acidification des jusées. Vers la même époque, PARKER et PROCTER (2) faisaient remarquer, d'une manière très générale, la destruction du tanin par les microorganismes, diminuant dans les solutions tanniques le rapport $\frac{\text{tanin}}{\text{non tanin}}$.

Une étude très complète des fermentations des jus tannants a été publiée par ANDREASCH (3) en 1897 ; l'auteur a nettement déterminé par l'analyse chimique les produits de la fermentation et par la recherche bactériologique, les espèces qui la provoquaient. L'analyse chimique a permis de déceler la présence, dans les milieux fermentés, d'alcool éthylique, d'anhydride carbonique, d'acide acétique et d'acide lactique. La formation de l'acide lactique serait due à l'action des ferments lactiques sur les jus sucrés. Quant à la formation de

(1) HAENLEIN, *D'Inglers*, 1894, p. 186.

(2) PARKER et PROCTER, Journ. off. *The soc. chem. Ind.*, 1895, p. 635.

(3) ANDREASCH, *Leather*, Trade Revue, 1898 ; *Gerber*, 1898 ; *Zettmar, Leder, Erzeugung*, p. 235.

l'acide acétique, ANDREASCH l'explique en admettant que dans une première phase les levures produisent de l'alcool à partir du glucose et que, dans une seconde phase, l'alcool est oxydé par le *Mycoderme acéti*.

Au point de vue bactériologique, ANDREASCH a classé les espèces microbiennes qui végètent dans les jus industriels de tannerie en trois groupes :

1° Le groupe des bactéries de la putréfaction : ces bactéries sont apportées dans le bain par les peaux en travail ; elles sont particulièrement abondantes dans les jus usagés, car ces bactéries se développent d'autant plus facilement que le milieu renferme moins de tanin et plus de protéines. Ces microorganismes n'effectuent aucune fermentation aigre ; ils sont fortement nuisibles, car ils solubilisent les protéines de la peau, enrichissent le milieu en matières azotées et activent ainsi la fermentation putride.

2° Le groupe des bactéries de l'air et de l'eau : ANDREASCH a observé que ces espèces sont nombreuses dans les jus tannants dilués, et qu'il s'en trouve même dans les extraits concentrés renfermant 25 à 30 % de matières tannantes. Dans son remarquable exposé, à côté d'une trentaine de bactéries proprement dites, l'auteur cite des moisissures telles que l'*Oïdium lactis*, le *Mucor mucedo*, le *Penicillium glaucum*.

3° Le groupe des agents de fermentation : dans ce groupe, ANDREASCH range les *Mycoderma vini* et *acéti* qui ont la propriété de former des voiles épais, quelques levures, des bactéries lactiques et acétiques, et finalement des moisissures.

Tout au début de ce siècle se situent les remarquables travaux de FERNBACH (1) sur la tannase. En cultivant l'*A. niger* sur le liquide de Raulin dont le sucre avait été remplacé par du tanin, FERNBACH est parvenu à isoler une diastase qu'il dénomme la *tannase*. Cette diastase, introduite dans une solution de tanin à 10 % y précipite à la température ordinaire des aiguilles d'acide gallique cristallisé.

POTTEVIN (2) vérifia la découverte de FERNBACH et montra que l'acide gallotannique devait être considéré comme un glucoside de l'acide digallique. En effet, ce produit naturel est hydrolysé par la tannase en glucose et acide gallique, ce dernier étant ensuite hydraté et transformé en acide gallique.

Les découvertes de FISCHER et de ses collaborateurs (3) ont magistralement confirmé les vues de FERNBACH et de POTTEVIN, en mettant parfaitement en évidence la liaison entre le glucose et l'acide gallique dans les tanins pyrogalliques. La méthode expérimentale de FISCHER a consisté, d'une part, à dédoubler en leurs composants principaux un grand nombre de tanins pyrogalliques et, d'autre part, à reconstituer un certain nombre de ces tanins par synthèse. Dans un très grand nombre de cas, le dédoublement analytique du tanin était effectué à l'aide de la tannase de FERNBACH.

(1) FERNBACH, *Comptes rendus Ac. Sc.*, 1900, p. 1214.

(2) POTTEVIN, *Comptes rendus Ac. Sc.*, 1900, p. 1215; *Comptes rendus Ac. Sc.*, 1901, p. 704.

(3) Voir l'exposé détaillé dans *La Tannerie*, T. I., p. 256, Gauthier-Villars, Paris, 1936.

FERDINAND JEAN (1), ED. NIHOUL et L. VAN DE PUTTE (2), le Docteur H. BECKER (3), J. T. WOOD et DOUGLAS (4) se sont également occupés de décrire la flore microbienne des jusées et d'étudier les conditions de température et de composition de milieu les plus favorables à leur développement.

TOICHI ASAI (5) classe les microorganismes en deux groupes principaux. Le premier groupe, celui des *hyphomyces*, comprend des champignons inférieurs que l'auteur a identifiés, et parmi lesquels figurent le *Mucor mucedo*, l'*A. niger*, le *Penicillium glaucum* de Link. Les champignons inférieurs du second groupe sont des levures telles que le *Saccharomyces apiculatus* de Hansen, le *pasteurianus* de Rees, le *Mycoderma tannica* non spécifié et la *Torula* non spécifiée.

LÉVINE (6), étudiant l'action du tanin sur les microorganismes végétant sur les jus tannants, constate qu'à la concentration de 15 % le tanin devient antiseptique pour les levures et les moisissures à l'exception toutefois de l'*A. niger*, l'*A. orizae* et du *Penicillium glaucum*.

VON E. HÖGGLUND et A. M. AUGUSTSON (7) notent que le pH qui convient le mieux au développement des levures est 4,5.

(1) Ferdinand JEAN, *Collegium*, 1902, p. 117.

(2) Ed. NIHOUL et L. VAN DE PUTTE, *Collegium*, 1904, p. 97.

(3) Dr. H. BECKER, *Collegium*, 1905, p. 136.

(4) J. T. WOOD et DOUGLAS, *Collegium*, 1910, p. 384.

(5) TOICHI ASAI, *J. A. L. C. A.*, 1919, p. 78 ; *Chim. Ind.*, 1920, p. 614 ; *Le cuir tech.*, vol. XV, 1927, p. 300.

(6) LEVINE, *Chim. Ind.*, 1922, p. 1094.

(7) VON E. HÖGGLUND et A. M. AUGUSTSON, *Biochem. ZTSCHR.*, 1925, pp. 150, 334.

GROUD (1) note la formation d'alcool éthylique, d'acides formique, acétique, butyrique et lactique dans la fermentation des jusées. Selon lui, l'acide acétique peut provenir de la fermentation de l'alcool sous l'influence des bactéries acétiques, l'alcool lui-même ayant été formé par la fermentation alcoolique des sucres. Parmi les moisissures qui interviennent dans la fermentation, GROUD a caractérisé le *Stérigmatocystis nigra* et le *Penicillium glaucum*.

VON K. SESKACHALAM et CHOU DARY (2) classent les ferments des jusées d'après leur aptitude à donner des liqueurs acides. Ils admettent que la production de l'acide acétique se fait à partir de l'alcool par les bactéries et non pas directement à partir des sucres. Ces auteurs supposent également que l'alcool et l'acide acétique sont ultérieurement détruits en acide carbonique et eau par des espèces du genre mycoderme. Enfin, ils admettent que la fermentation lactique ne commence que lorsque la fermentation acétique est terminée, et qu'elle se trouve notablement facilitée par une réaction acide faible, la présence d'ions phosphoriques, de matières azotées, et par la pauvreté du milieu en tanin. VON K. SESKACHALAM et CHOU DARY considèrent le *Penicillium glaucum* comme étant l'agent le plus actif de destruction du tanin.

L'étude de la formation de l'acide lactique dans les jus tannants a intéressé, ces dernières années, de

(1) GROUD, *Le cuir tech.*, 1925, p. 313.

(2) VON K. SESKACHALAM et CHOU DARY, *J. S. L. T. C.*, t. IX, 1925, pp. 111, 123 ; *Chim. Ind.*, 1926, pp. 441, 2810.

nombreux auteurs et particulièrement DOELGER (1) et DOHERTY (2) qui recherchèrent tout d'abord les différents microorganismes capables de dédoubler le tanin et de former de l'acide lactique; puis ils étudièrent les différents facteurs pouvant faire varier cette production en acide lactique, tels que la composition du milieu, la concentration en azote organique, en tanin, en acide lactique, le pH, etc... Plus récemment encore, E. DOHERTY a étudié l'influence de divers facteurs sur la fermentation lactique des jusées; il a constaté que le facteur de croissance apporté par des levures était nécessaire pour la fermentation par les bacilles lactiques, il a cherché également l'influence de l'addition de sels minéraux tels que les sels ammoniacaux, les sels de cuivre et de magnésium.

BALACHOWSKI (3), HAMPSHIRE (4), KÜHL et BLAUK (5), étudièrent également les microorganismes rencontrés dans les jus tannants. KÜHL et BLAUK les classèrent en trois groupes: ceux produisant l'acide lactique, ceux le détruisant, et enfin ceux ne le formant pas et ne le détruisant pas. Ils mirent également au point différentes mé-

(1) DOELGER, *J. A. L. C. A.*, 1935, p. 586; *J. A. L. C. A.*, 1936, p. 46; *J. A. L. C. A.*, 1936, p. 531; *J. A. L. C. A.*, 1937, vol. XXXII, p. 265.

(2) DOHERTY E., *J. A. L. C. A.*, 1937, vol. XXXII, p. 551; *J. A. L. C. A.*, 1939, p. 187.

(3) BALACHOWSKI, *Westnik der Lederling und Lederh*, 1929, p. 9; *Westnik der Lederling und Lederh*, 1929, p. 511.

(4) HAMPSHIRE P., *Bull. Bur. Bis. Technology*, 1933, pp. 249, 251.

(5) KÜHL, *Ledertechnische Rundschau*, 1915.

thodes capables de contrôler la teneur en acide lactique contenu dans les jus.

Et, pour terminer cet exposé, nous citerons les récents travaux de DALVI (1), V. P. DOELGER, R. PATRIDGE, L. SCHREIBERG et J. AMER (2) dans le but d'identifier différentes levures et moisissures dans des jusées de composition et d'ancienneté variables. La *Torula* et le *Mycoderma* y sont particulièrement mentionnés avec pour rôle spécifique la dégradation des acides formés par les bactéries.

En résumé, en l'état actuel de nos connaissances, les microorganismes de la fermentation des jus tannants peuvent être classés en cinq groupes principaux, à savoir :

les levures et les mycodermes,

les ferments de l'acide acétique, qui sont pour la plupart des bactéries,

Les ferments lactiques comprenant des levures et des bactéries,

les ferments butyriques,

les moisissures, et plus particulièrement l'*A. niger*, l'*A. orizaé*, le *Penicillium glaucum*.

Tous ces germes peuvent s'ensemencer spontanément dans les jus tannants, soit qu'ils préexistent dans la matière tannante, soit qu'ils soient apportés par l'air ou par l'eau. Suivant la composition du milieu, c'est-à-dire suivant sa teneur en sucres, hydrates de carbone, tanin, matières minérales, le degré d'acidité, les conditions de

(1) DALVI, *Chem. Ind.* 1931, p. 1172.

(2) V. P. DOELGER, R. PATRIDGE, L. SCHREIBERG et J. AMER, *Coll.*, 1936, p. 207.

température, etc..., telle ou telle espèce pourra se développer au détriment des autres. Il en résulte que dans une jusée il peut se produire pour le moins trois principales sortes de fermentation (1) :

1° les fermentations alcooliques et les fermentations acides (fermentations acétique et lactique) ;

2° la fermentation des tanins pyrogalliques et leur dédoublement en acide gallique et glucose ;

3° la fermentation putride.

Nous avons essayé d'isoler et d'identifier quelques-uns des microorganismes de ces fermentations afin de pouvoir étudier les conditions de milieu et de température qui conviennent le mieux à leur développement, ainsi que les produits de dégradation auxquels ils donnent naissance.

Notre étude s'est limitée aux levures et aux microorganismes à forme lévurienne qui forment un voile à la surface des jusées ; ce sont ces microbes des jus tanants qui ont été le moins étudiés et dont les effets sont les moins connus.

(1) Ces principes de classification ont été exposés par C. VANEY et P. CHAMBARD dans la *Tannerie*, Gauthier-Villars, édit., Paris, 1936, t. I, p. 382.

DEUXIÈME PARTIE

**Etude Expérimentale de la Fermentation
des Liqueurs Tanniques**

CHAPITRE PREMIER

Séparation et Caractérisation de Levures ou autres Microorganismes à formes levuriennes végétant sur les jus tannants

Nous avons eu recours, pour obtenir les espèces microbiennes que nous recherchions, à des jus tannants en service dans l'atelier expérimental de l'Ecole de Tannerie. Certains d'entre eux constituaient un « *train de basserie* » destiné au tannage de gros cuir pour semelles ; ils étaient constitués par des mélanges de tanins parmi lesquels figuraient de l'extrait sulfité de bois de québracho, de l'extrait de bois de châtaignier et, dans une proportion plus faible, de l'extrait d'écorce de mimosa. Ces diverses matières tannantes se trouvaient en proportions variables, les jusées les plus diluées étant les plus riches en extrait de québracho.

D'autres jus tannants étaient destinés au tannage de peaux de moutons ; ils étaient constitués par un mélange d'extrait de myrobolam et d'extrait de sumac.

Sur les jusées de basserie, on pouvait noter la présence d'un voile particulièrement abondant sur les jus

de concentration moyenne (1 à 3 % de tanin) et relativement pauvre en extrait de québracho. La fermentation sous-jacente ne paraissait pas très active, au moins en ce qui concerne la fermentation alcoolique, car on ne notait pas de dégagements gazeux.

La fermentation paraissait un peu plus active dans le cas des jusées myrobolam-sumac. On ne pouvait noter, à vrai dire, que quelques bulles de gaz, mais le liquide répandait une odeur fruitée rappelant celle de la fermentation alcoolique et aussi celle des éthers, tel que l'acétate d'éthyle. Le voile, sec et plissé, était particulièrement abondant sur ces derniers jus.

Un examen microscopique immédiat de ces voiles les montrait formés d'éléments ovoïdes ou arrondis, ou plus allongés en forme de gros bâtonnets; l'aspect général était assez analogue à celui du voile mycodermique désigné sous le nom de fleur du vin.

Un examen microscopique du liquide boueux soutiré au fond de la cuve permettait également d'observer des éléments dont la forme était celle des levures.

Nous avons donc prélevé du liquide superficiel, en même temps des fragments du voile mycodermique et du liquide boueux soutiré au fond des cuves.

C'est sur ces prélèvements que nous avons effectué la séparation des espèces microbiennes que nous nous proposons d'étudier.

Les semences ainsi extraites, qui représentaient des colonies microbiennes très mélangées, ont été immédia-

tement délayées dans un bouillon pour levures dont voici la composition : (1)

Sucre candi	150 gr.
Tourillons	75 gr.
Eau Q. S.	1500 gr.

Ce bouillon renferme 0,7 % d'azote.

Après trois jours d'incubation à 20-22° C., nous avons entrepris la séparation sur boîtes de Pétri. Il nous a été possible de retirer du *voile* qui recouvrait la cuve *québracho-sulfité-châtaignier* cinq espèces microbiennes que nous avons dénommées :

Jusée voile A
— — B
— — C
— — D
— — E

Suivant la même technique, nous avons pu retirer du *voile* superficiel de la cuve *myrobolam-sumac*, les quatre espèces ci-dessous :

Myro I
— IV
— B
— C

et du liquide de *fond* de la même cuve, deux espèces :

le Myro D
et le Myro E

Pour l'identification de ces cultures, nous avons appliqué la technique décrite par Guillermont dans l'ouvrage

(1) Ce bouillon se prépare suivant le mode général de préparation des bouillons pour levures ; il peut d'ailleurs être solidifié ultérieurement par addition de 10 à 15 % de gélatine, ou de 1 à 5 % de gélose.

intitulé : « Clef dichotomique pour la détermination des levures ». La méthode consiste, dans son principe général, à repiquer chaque colonie dans un bouillon stérile de moût de bière et à laisser incuber pendant quatre jours à 20°/23° C. ; la composition de ce moût de bière est la suivante :

Malt en poudre sèche..	200 gr.
Eau	1000 cc.
Houblon	4 gr.

En fin de préparation, la teneur en maltose de ce bouillon est ajustée à 3 % par simple dilution à l'eau.

Après les quatre jours d'incubation, un second repiquage est effectué et, après une nouvelle incubation de quatre jours, on procède à l'examen des colonies.

MÉTHODES D'EXAMEN DES COLONIES :

Le procédé dit *de la chambre humide de Bottcher* permet de suivre les diverses phases du développement des microorganismes, d'observer la formation des asques et des conidies, la germination des ascospores. Au moment d'effectuer l'examen, on place une goutte d'eau stérilisée au fond de la chambre, qui est elle-même stérile, et une goutte du milieu à étudier sur un couvre-objet également stérile. On renverse ensuite le couvre-objet sur l'anneau de façon à obtenir une goutte pendante au milieu de cet anneau. L'anneau a été préalablement enduit de vaseline stérilisée de façon à obtenir une fermeture parfaite et à éviter la pollution par l'air ambiant. La chambre humide est alors placée sur le microscope à l'aide duquel on peut désormais suivre les

différentes phases du développement des microorganismes.

Toutes nos mensurations ont été effectuées à l'aide d'un micromètre objectif.

D'autre part, pour plus de précision dans les observations, nous avons photographié le micromètre avec

TABLEAU I

Objet photographié	Plaque	Emulsion	Temps de pose	Eclairage	Grossissement	
Micromètre Zeiss 0,01 mm.	Agfa	Chromos isorapide 23°5 Scheiner	45 secondes	Nachet 228-40	300 diamètres	
Monilia forme mycélienne fixée à chaud.	d°	d°	60 minutes	d°	675	d°
Monilia avec couvre-objet	d°	d°	5 minutes 1/2	d°	300	d°
d° d°	d°	d°	18 d°	d°	450	d°
Micromètre Zeiss 0,01 mm.	d°	d°	2 d°	d°	450	d°
Torula avec couvre-objet	d°	d°	7 d°	d°	300	d°
Monilia forme levurienne	d°	d°	7 d°	d°	300	d°
Mycoderme couvre-objet	d°	d°	7 d°	d°	300	d°
Saccharomycès couvre-objet	d°	d°	7 d°	d°	300	d°

TABLEAU DES GROSSISSEMENTS

Objectif	Oculaire	Chambre noire	Grossissement total
40	15	0,5	300 diamètres
90	15	0,5	675 d°
90	10	0,5	450 —

un appareil Miflex Zeiss et nous avons rapporté cette échelle à chaque photographie de cultures afin de reproduire aussi exactement que possible la dimension des cellules. Malgré les instructions générales données par le constructeur, la mise au point des photographies a nécessité de nombreux tâtonnements ; aussi nous a-t-il

paru utile de relever dans un tableau les données pratiques qui nous ont fourni les meilleurs résultats. Voir tableau I.)

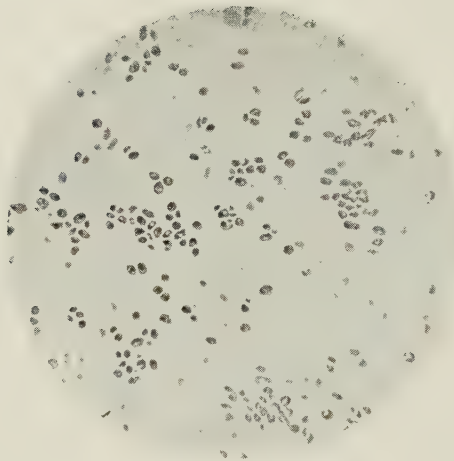
**Monographie des Microorganismes de la fermentation
du jus tannant
Quebracho — Châtaignier**

1° JUSÉE VOILE A

A l'examen microscopique, on observe, sur milieu de touraillons gélosé, une colonie blanche, semi-brillante, légèrement festonnée sur les bords et granuleuse. Le développement de cette colonie sur ce milieu solide est très avancé en quarante-huit heures.

Sur bouillon, après trente-six heures, il se forme un trouble et un abondant dépôt végétatif, de couleur beige. L'examen microscopique des cultures en bouillon ou sur gélose conduit aux mêmes constatations. On remarque des cellules rondes ayant en leur centre, soit un gros globule graisseux, soit des enclaves graisseuses. Lorsque la cellule devient âgée, sa membrane se dédouble en deux enveloppes concentriques, puis celle qui se trouve à l'extérieur se déchire et se transforme plus ou moins complètement en un mucilage.

La reproduction des cellules se fait par bourgeonnement tout autour de la cellule mère dont les zones concentriques deviennent de plus en plus visibles au fur et à mesure du développement des cellules filles. La vacuole graisseuse, qui au début est très réfringente, perd de plus en plus cette propriété pour n'être plus finalement qu'un simple dépôt de mucilage.



TORULA

G. = 300 diam.

Ces constatations nous permettent de conclure que le microorganisme *jusée voile A* appartient au genre *Torula*. Nous n'avons pas pu en déterminer l'espèce, nous désignerons ce microorganisme par la dénomination *Torula jusae*.

2° JUSÉE VOILE B

1° *Examen macroscopique :*

Sur gélose inclinée, nous observons une abondante colonie de teinte ivoire à l'aspect humide et granuleux présentant en surface des aspérités irrégulières.

Après quatre jours d'incubation en bouillon, un anneau commence à se former ; après six jours, cet anneau s'étend sur toute la surface du liquide en formant un voile sec de couleur grisâtre, plissé et opaque. Ce voile est de nature mycodermique. D'autre part on constate qu'il s'est rassemblé au fond du bouillon un dépôt végétatif jaunâtre.

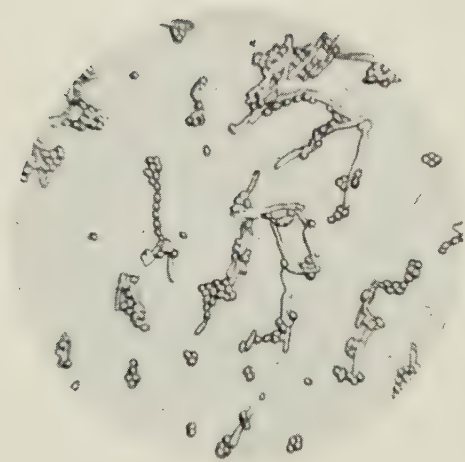
2° *Examen microscopique :*

L'examen microscopique du voile d'une culture de six jours sur levure révèle tout un ensemble de cellules ovoïdes (1). Ces dernières contiennent une ou plusieurs vacuoles à corpuscule métachromatique généralement terminal, et quelquefois, une vacuole glycogénique qui se distingue du fait que la coloration à l'hématoxyline lui donne une teinte plus diffuse.

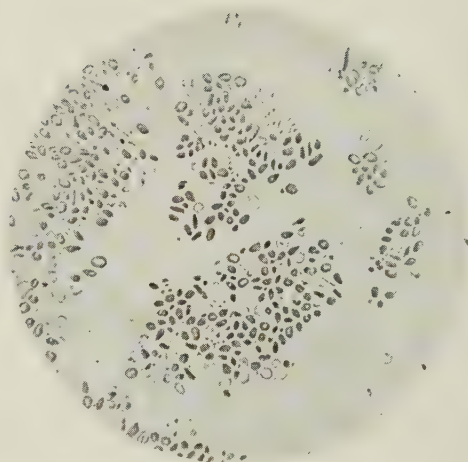
(1) Les préparations ont été montées à la gomme arabique, afin d'éviter les mouvements Brownien.

On remarque aussi des cellules très allongées qui semblent soudées les unes aux autres et paraissent comporter également des corpuscules métachromatiques et glyco-géniques. Par endroits, l'on peut voir un mycélium typique du genre *Monilia* donnant naissance à des bourgeonnements, le plus souvent terminaux, et quelquefois latéraux. Le procédé de la chambre humide de Bottcher permet d'observer ce bourgeonnement et de constater en outre que certains filaments mycéliens se désarticulent pour donner naissance à des segments de mycélium ou arthrospores.

A côté de cette forme mycélienne, il est possible de faire se développer une forme lévurienne. En effet, si l'on ensemence un milieu constitué de substances minérales, de sucre et de tanin, avec la colonie mycélienne que nous venons de décrire, il est intéressant de constater que cette dernière disparaît presque totalement dès que la concentration en tanin atteint 8 %. Dans ces conditions la forme levurienne seule subsiste et se développe; on perçoit alors des amas de cellules plus ou moins arrondies présentant tous les caractères précédemment décrits. De plus il est possible de faire réapparaître la forme mycélienne en repiquant à deux ou trois reprises, sur le bouillon de touraillons ou bien sur le moût de bière, ces milieux ne renfermant pas de tanin. D'une façon générale nous avons observé que la forme mycélienne se développe lorsque le milieu nutritif répond aux conditions optima de végétation, tandis que, par contre, dans un milieu épuisé ou convenant mal, c'est la forme lévurienne qui prédomine. En d'autres termes, la forme levurienne nous apparaît comme la forme de



Forme mycélienne



Forme levurienne

MONILIA VARIABILIS

G = 300 diam.

résistance du microorganisme. Nous avons pu également noter, d'autre part, que les cultures en bouillons donnent le plus souvent la forme levurienne tandis que la forme mycélienne apparaît plutôt sur les supports gélosés, c'est-à-dire solides.

Cet ensemble de propriétés caractérise assez nettement la *Monilia variabilis* qui fut découverte par LINDNER et HENNELERG et qui donne lieu à une très grande variété de formes. Ce genre de *Monilia* tend à se rapprocher des moisissures lorsque le milieu nutritif lui convient parfaitement et s'en écarte pour aller rejoindre les levures lorsque le milieu devient défavorable.

3° JUSÉE VOILE C

L'examen macroscopique et microscopique de cette colonie permet de la ranger dans le groupe des *Torula*. Comme nous n'avons pas pu cependant rapporter les caractères de cette *Torula* à ceux d'une espèce précédemment décrite, nous l'avons désignée sous le nom de *Torula jusae*.

Nous verrons, par la suite, que cette espèce est fréquente dans la fermentation du tanin *sumac-myrobolam*.

4° JUSÉE VOILE D

Examen macroscopique :

Trois jours après le repiquage sur gélose inclinée, on observe une abondante colonie mate, mais qui devient brillante et humide à partir du quinzième jour. Elle possède une teinte ivoire, plus ou moins blanche sur les bords ; les bords sont irréguliers, crénelés ; la surface

est également irrégulière. De nombreux essais de séparation sur boîtes de Pétri nous permettent de nous assurer qu'il ne s'agit pas d'une pollution, et que, malgré les différences observées dans la coloration de la colonie, on se trouve en présence d'une seule et même espèce.

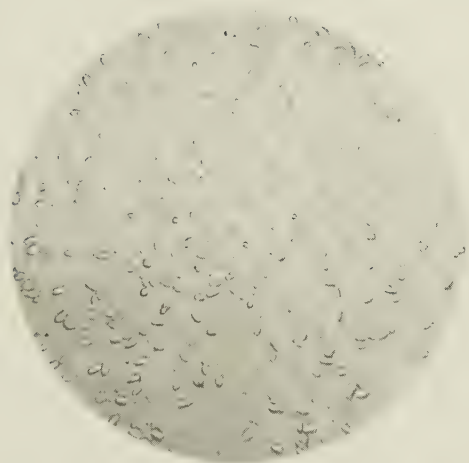
Sur bouillon, il se forme des îlots qui ne tardent pas à se grouper pour constituer un voile blanc grisâtre, mince et fragile ; au fond du tube, il se produit un dépôt végétatif, brun, assez volumineux, adhérant aux parois du tube.

Examen microscopique :

Une préparation d'une culture sur gélose inclinée permet de voir, d'une part, des cellules généralement cylindriques, arrondies aux extrémités, plus ou moins allongées, quelquefois réunies bout à bout et, d'autre part, des cellules ovales.

Dans une préparation colorée à l'hématoxyline, on peut voir, au centre de la cellule, une vacuole allongée apparaissant en rose, et des granules très réfringents en nombre assez variable (de 0 à 5 suivant les cellules).

A la chambre humide, on voit qu'il n'y a pas formation de spores et que la reproduction se fait par bourgeonnement à l'une des extrémités de la cellule, dans le sens de la longueur. Il se forme tout d'abord la vacuole de la cellule fille ; à ce moment il semble que la cellule primitive a deux vacuoles, puis les parois de la cellule mère se rétrécissent entre les deux vacuoles et finalement deux cellules nouvelles apparaissent. Ces caractères nous permettent de conclure que le microorganisme de la jusée voile D est un *Mycoderme*.



MYCODERME

G = 300 diam.

Enfin, la colonie dite *jusée voile E* se révèle, à l'examen microscopique et après étude de ses caractères de culture, en tous points identique au *Mycoderme* précédent.

**Monographie des Microorganismes
de la Fermentation du jus tannant
Myrobolam-Sumac**

Comme nous l'avons indiqué précédemment nous avons pu retirer du *voile* les quatre colonies suivantes :

Myro I
— IV
— B
— C

et du liquide de *fond* de la même cuve, le

le Myro D
et le Myro C

Après examen détaillé, nous avons pu identifier les quatre premières espèces microbiennes retirées du *voile* comme appartenant au genre *torula*. Elles sont identiques à la *Torula* qui a été identifiée dans la fermentation des jusées de basserie.

Myro Fond D

Sur gélose inclinée, il apparaît, après trois jours, une colonie d'aspect humide, à surface lisse.

Sur bouillons de touraillons ou de moût de bière, nous remarquons, après le même temps, un léger trouble et un dépôt végétatif grisâtre ; au bout de trois mois environ, on voit apparaître un anneau très fragile.

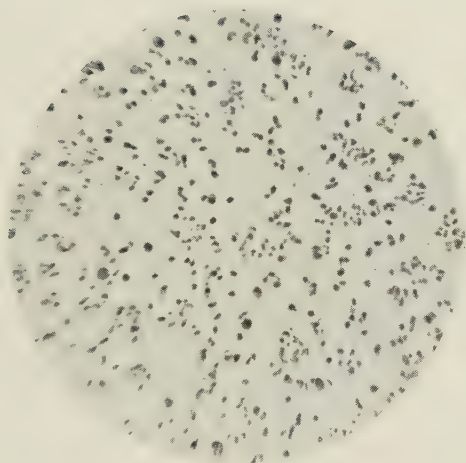
On constate, au microscope, que les préparations obtenues soit à partir d'une culture sur milieu gélosé, soit à partir d'un bouillon, sont identiques. Elles présentent une série de cellules de forme ovoïde isolées ou placées à la suite les unes des autres. Ces cellules sont très petites; chacune d'elles comporte une vacuole qui se trouve généralement placée au centre. Des points métachromatiques très réfringents se détachent nettement surtout si la préparation examinée a été préalablement colorée à l'hématoxyline. Par endroits, nous notons la présence de cellules plus allongées que les précédentes et ayant plus ou moins la forme d'un boudin.

Cette espèce levurienne qui a la propriété de transformer le saccharose en glucose et de ne pas fermenter le maltose, a tous les caractères morphologiques d'un *Saccharomyces* constituant le deuxième sous-groupe de la classification de GUILLERMOND (1). Il est très probable qu'il s'agit dans ce cas particulier du *Saccharomyces marxianus* étudié par HANSEN (2). Les cellules de cette levure se conjuguent deux à deux pour donner lieu à une copulation hétérogamique. A la chambre humide, on remarque qu'elles donnent lieu également à des copulations isogamiques et qu'elles peuvent aussi se reproduire par simple bourgeonnement.

Enfin, la deuxième espèce microbienne retirée du liquide et provisoirement dénommée *Myro C* est aussi un *Saccharomyces* du genre précédent.

(1) GUILLERMOND, *Clef dichotomique pour la détermination des levures*, p. 109, 1928.

(2) HANSEN, C. R. Lab. Carlsberg, 1888.



SACCHAROMYCES MARXIANUS

G = 300 diam.

En résumé, il résulte de cette première étude que les microorganismes de la fermentation d'une jusée Sumac-Myrobolam sont de deux sortes : les *Saccharomyces* qui végètent dans les parties profondes du liquide et les *Torula* qui forment le voile superficiel, tandis que les microorganismes de la fermentation d'une jusée québracho-sulfité-châtaignier sont : des *Monilia*, des *Torula* et des *Mycoderma*.

CHAPITRE II

Influence de la composition du milieu sur le développement des Microorganismes

Les cultures des microorganismes qui nous intéressent ont été entretenues sur le milieu même qui avait servi à leur séparation, c'est-à-dire sur l'eau de touraillon sucrée.

Pour effectuer leur étude, il était intéressant pour nous de déterminer la composition d'un milieu qui leur soit particulièrement favorable et, si possible, la composition d'un milieu convenable pour leur culture et ne renfermant que des substances bien définies. Dans un tel milieu l'azote devait être introduit sous forme de composés minéraux ou bien de composés organiques relativement simples tels que les acides aminés.

Pour déterminer la composition de ce milieu, nous avons pris comme base le liquide de Raulin, dans lequel nous avons supprimé l'acide tartrique, l'acidité considérable apportée par ce composant ne convenant pas à nos levures.

Ce milieu témoin avait la composition suivante :

Sucre candi	100 gr.
Chlorure de potassium.....	2 gr.
Chlorure de sodium	1 gr.
Silicate de soude.....	0 gr. 5
Sulfate d'ammonium	2 gr.
Sulfate ferreux	0 gr. 05
Sulfate de zinc.....	0 gr. 05
Eau distillée Q. S.....	1000 cc.

Il est parfaitement limpide et incolore, son acidité de pH avant la stérilisation en autoclave est de 6,2. En incorporant à ce bouillon des substances minérales ou organiques, nous pouvons en modifier les propriétés nutritives de telle sorte que le développement de telle ou telle espèce microbienne s'en trouvera favorisé ou, au contraire, entravé.

Le mode opératoire consiste à stériliser quatre prises d'essai de 100 cc. du bouillon à étudier, dans quatre ballons de 500 cc. de capacité, puis à les ensemercer respectivement avec 1 cm³ d'un bouillon de *Torula*, 1 cm³ de *Saccharomyces*, 1 cm³ de *Monilia* et 1 cm³ de *Mycoderme*. Pour avoir des cultures très actives nous prélevons 1 cm³ d'une culture âgée de cinq jours, provenant elle-même d'une souche ayant également cinq jours d'incubation. Après vingt jours d'incubation les cellules sont séparées par centrifugation et lavées à deux reprises à l'eau distillée à 60° C. dans le tube même de centrifugation.

On peut alors constater que l'eau de lavage ne contient plus de sucre, ni de sels minéraux. La purification des cellules étant complétée par deux lavages à l'alcool à 95°, par centrifugation, celles-ci sont ensuite rassem-

blées dans une coupelle en platine, séchées, d'abord au bain-marie, ensuite à l'étuve à moyenne température, et, finalement, pesées.

Dans le tableau ci-après sont consignés les résultats qui ont été obtenus dans une première série d'expériences effectuées avec le bouillon le plus simple dont la composition est indiquée au début de ce chapitre. (Voir tableau II.)

TABLEAU II

ESSAIS TÉMOINS INDIQUANT LA CROISSANCE DES MICROORGANISMES DES JUSEES DANS UN BOUILLON TÉMOIN

Conditions expérimentales :

Volume de bouillon	100 cc.
Température.....	20-22° C.
Durée d'incubation	15 jours.

Levures ensemencées	EXAMEN MACROSCOPIQUE			EXAMEN MICROSCOPIQUE	Poids de la culture après dessication, en milligrammes
	du dépôt végétatif	du voile	du milieu		
Témoin.	Inexistant.	Inexistant.	Très limpide	Aucune cellule.	0
Torula.	Abondant.	Inexistant.	Nettement troublé.	Très peu de cellules.	124
Saccharo- myces.	Peu abondant.	Inexistant.	Limpide.	Petites cellules, rien de particulier.	12
Monilia.	Assez abondant.	Extrême- ment léger.	Légèrement troublé.	Cellules petites, de forme levurienne. Forme my- celienne pour 2 ou 3 éléments au maximum.	62
Mycoderme.	Assez abondant.	De légères plages.	Très légè- rement troublé	Rien de particulier.	46

La valeur nutritive du bouillon étant ainsi en quelque sorte représentée quantitativement par le poids de culture microbienne obtenu pour une durée d'incubation déterminée, nous pourrions étudier en premier lieu l'influence des anions et des cations des sels minéraux les plus usuels.

Influence de l'ion nitrique (NO³)⁻ :

Nous ensemençons dans les mêmes conditions que précédemment quatre milieux préparés à partir de 100 cc. du même bouillon, mais préalablement additionné de nitrate d'ammonium dans la proportion de 4 o/oo.

Nous examinons tous les jours les modifications qui peuvent se produire et, après quinze jours d'incubation, nous procédons aux déterminations d'ordre quantitatif. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau III.

TABLEAU III
INFLUENCE DE L'ION NITRIQUE NO³-

Conditions expérimentales :

Volume de bouillon	100 cc.
Teneur en nitrate d'Ammonium.....	4 o/oo.
Température.....	20-22° C.
Durée d'incubation	15 jours.

Levures ensemencées	EXAMEN MACROSCOPIQUE			EXAMEN MICROSCOPIQUE	Poids de la culture, après dessiccation, en milligrammes
	du dépôt végétatif	du voile	du milieu		
Torula.	Assez abondant.	Inexistant.	Troublé.	Rien de particulier.	48
Saccharo- myces.	Assez abondant.	Inexistant.	Limpide.	Cellules rondes plus grosses qu'à l'ordinaire.	24
Monilia.	Peu abondant.	Inexistant.	Limpide.	Très peu de cellules, la forme levurienne est la plus abondante.	18
Mycoderme.	Assez abondant.	Inexistant.	Limpide.	Rien de particulier.	27

Les résultats inscrits dans les tableaux II et III montrent que les milieux renfermant du nitrate ont donné des cultures de deux à trois fois plus faibles, dans le cas de trois levures : *Torula*, *Monilia* et *Mycoderma*.

L'ion nitrique est donc à exclure de la préparation des milieux pour ces levures.

Par contre la présence de cet ion NO_3^- favorise très sensiblement le développement du *Saccharomyces* puisqu'il a permis d'obtenir un poids de culture deux fois plus élevé.

Influence de l'ion phosphorique (PO_4) ---

Dans les essais relatifs à cette étude, les ions phosphoriques sont incorporés au milieu de culture moyennant une addition de 2 gr. 0/00 de phosphate bipotas-

TABLEAU IV
INFLUENCE DE L'ION PHOSPHORIQUE PO_4

Conditions expérimentales :

Volume de bouillon	100 cc.
Teneur en phosphates	4 0/00
Température.....	20-22° C.
Durée d'incubation	15 jours.

Levures ensemencées	EXAMEN MACROSCOPIQUE			EXAMEN MICROSCOPIQUE	Poids de la culture, après dessication, en milligrammes
	du dépôt végétatif	du voile	du milieu		
Torula.	Abondant.	Quelques plages très légères.	Nettement troublé.	Cellules rondes, quelques cellules mères à zones concentriques en voie de bourgeonnement.	51
Saccharo- myces.	Assez abondant.	Inexistant.	Limpide.	Nombreuses petites cel- lules rondes, plus peti- tes qu'à l'ordinaire.	19
Monilia.	Assez abondant.	Extrême- ment léger.	Limpide.	Cellules à forme levu- rienne, caractéristique du genre Monilia.	25
Mycoderme.	Assez abondant.	Inexistant.	Légère- ment troublé.	Grosses et petites cellules rondes ou ovoïdes, pos- sédant une grosse vau- cuole généralement au centre de la cellule.	142

sique et d'une quantité égale de phosphate d'ammonium $\text{PO}^4 \text{H} (\text{NH}^4)^2$. Les résultats obtenus, rassemblés dans le tableau IV (page 44) montrent que les cultures des levures de *Torula* et de *Monilia* ont diminué respectivement dans les proportions de 124 à 51 et de 62 à 25.

Ils indiquent, par contre, que le développement du *Mycoderme* est devenu quatre fois plus important et que la croissance du *Saccharomyces* a subi une légère amélioration.

En conséquence, on pourra avantageusement incorporer des phosphates de potasse et d'ammoniaque aux bouillons réservés à la culture du *Mycoderme* et du *Saccharomyces* ; mais l'emploi de ces mêmes substances est à éviter si l'on veut obtenir une pousse convenable des levures de *Torula* ou de *Monilia*.

Influence des cations Magnésium et Calcium.

Suivant le même procédé que pour les anions, nous étudions l'influence du cation Mg et du cation Ca, sur la croissance des microorganismes des jusées, cultivés en bouillon. Les conditions expérimentales et les résultats obtenus sont exposés dans les tableaux V et VI. Comme on peut s'en rendre compte à l'examen des chiffres contenus dans ces tableaux, les deux cations bivalents Mg^{++} et Ca^{++} se comportent assez différemment. (Voir tableaux V et VI.)

Le Magnésium retarde considérablement la pousse de la levure *Torula* ; cette pousse n'équivaut en effet qu'à un quart environ de celle du témoin (voir tableau II). Il contrarie aussi quelque peu le développement du *Mycoderme*.

TABLEAU V
INFLUENCE DU CATION MAGNESIUM Mg^{++}

Conditions expérimentales :

Volume de bouillon	100 cc.
Teneur en chlorure de magnésium	4 ‰.
Température	20-22° C.
Durée d'incubation	15 jours.

Levures ensemencées	EXAMEN MACROSCOPIQUE			EXAMEN MICROSCOPIQUE	Poids de la culture après dessiccation, en milligrammes
	du dépôt végétatif	du voile	du milieu		
Torula.	Abondant.	Inexistant.	Nettement troublé.	Quelques grosses cellules qui sont vraisemblable- ment des cellules mères et vieilles, for- mées de zones con- centriques. Aucun bourgeonnement. Très peu de petites cellules.	35
Saccharo- myces.	Peu abondant.	Inexistant.	Limpide.	Très peu de cellules.	21
Monilia.	Abondant.	Très léger.	Troublé.	Forme levurienne exclu- sivement, cellules gé- néralement rondes ou légèrement aplaties, possédant une vacuo- le très grasse au cen- tre de laquelle on aper- çoit un point métach- romatique.	55
Mycoderme.	Assez abondant.	De légères zones.	Légèrement troublé.	Peu de cellules ; forme plutôt allongée.	30

derme mais semble n'exercer aucune action sur la *Moni-
lia*. Seule la culture du *Saccharomyces* s'est trouvée net-
tement accrue par l'addition de sels de magnésium au
bouillon.

Le cation calcium est favorable au développement des
quatre espèces microbiennes étudiées ; en particulier les
cultures de *Mycoderma* et de *Saccharomyces* sont res-
pectivement triplées et doublées.

TABLEAU VI
INFLUENCE DU CATHION Ca^{++} .

Conditions expérimentales :

Volume de bouillon	100 cc.
Teneur en chlorure de calcium	4 ‰.
Température.....	20-22° C.
Durée d'incubation	15 jours.

Levures ensemencées	EXAMEN MACROSCOPIQUE			EXAMEN MICROSCOPIQUE	Poids de la culture, après dessication, en milligrammes
	du dépôt végétatif	du voile	du milieu		
Torula.	Très abondant.	Inexistant.	Très troublé.	Rien de particulier.	133
Saccharo- myces	Assez abondant.	Inexistant.	Légèrement troublé.	Cellules très rares, rien de particulier.	29
Monilia.	Assez abondant.	Très léger.	Troublé.	Forme levurienne ; ab- sence presque totale du mycelium. Cellules gé- néralement rondes.	77
Mycoderme.	Abondant.	Légères plages.	Légèrement troublé.	Cellules généralement rondes, légèrement aplaties au centre.	132

*Influence des substances azotées et de la nature de ces
substances sur la valeur nutritive du milieu de
culture.*

Parmi les substances organiques, les matières azotées méritent de retenir plus particulièrement notre attention en raison de leur action reconnue sur le développement d'un grand nombre de microorganismes. Ces aliments azotés nécessaires à la nutrition des levures leur sont ordinairement apportés sous forme de composés organiques ; d'une manière générale les levures s'accommodent assez mal des aliments azotés minéraux.

Cependant, comme nous nous proposons d'étudier ultérieurement l'action de ces levures sur le tanin, tanin

que nous serons amenés à doser dans les milieux de fermentation, et que la présence de composés organiques dans ce milieu ajoute une difficulté considérable pour ce dosage, nous avons tenté de réaliser un milieu de culture purement minéral, c'est-à-dire ne renfermant pas d'autres aliments organiques que le sucre.

Nous avons donc étudié l'influence sur nos levures de différents composés azotés minéraux et organiques.

Pour cela, nous avons préparé d'abord un milieu totalement exempt d'azote ayant la composition suivante :

Sucre candi	100 gr.
Chlorure de potassium.....	2 gr.
Chlorure de sodium.....	1 gr.
Silicate de soude.....	0 gr. 5
Sulfate de fer.....	0 gr. 05
Sulfate de zinc.....	0 gr. 05
Eau distillée Q. S.....	1.000 cc.

Comme on peut s'en rendre compte en examinant le tableau VII, ce bouillon qui est totalement exempt d'azote ne possède qu'un bien médiocre pouvoir nutritif vis-à-vis des microorganismes ensemencés avec lesquels il donne des pousses très faibles, sinon nulles. Il nous servira cependant de témoin. (Voir tableau VII.)

Il convient de faire observer d'ailleurs que les bouillons ordinaires pour levures que l'on prépare couramment dans les laboratoires de bactériologie à l'aide de touraillons d'orge, renferment environ 0,7 0/00 d'azote dosé par la *méthode de Kjeldahl*.

Influence de l'azote ammoniacal :

Un milieu de culture contenant 0,7 0/00 d'azote ammoniacal peut être obtenu très aisément en incorporant

TABLEAU VII

ENSEMENCEMENT OPÉRÉ DANS UN MILIEU EXEMPT D'AZOTE.
(Essais témoins).

Conditions expérimentales :

Volume de bouillon	100 cc.
Teneur en azote organique	nulle.
Température.....	20-22° C.
Durée d'incubation	15 jours.

Levures ensemencées	EXAMEN MACROSCOPIQUE			EXAMEN MICROSCOPIQUE	Poids de la culture après dessiccation, en milligrammes
	du dépôt végétatif	du voile	du milieu		
Torula.	Léger dépôt blanc.	Inexistant.	Légèrement troublé.	Assez peu de cellules.	17
Saccharo- myces.	Très léger presque inexistant.	Inexistant.	Très clair.	Très peu de cellules.	9
Monilia.	Blanc, assez abondant.	Très léger et fragile.	Légèrement troublé.	Nombreuses cellules à forme levurienne seu- lement.	22
Mycoderme.	Léger dépôt blanc.	Inexistant.	Clair.	Nombreuses cellules.	25

3 gr. 3 de sulfate d'ammonium pur cristallisé à un litre de bouillon minéral sucré. Les déterminations d'ordre quantitatif exposées dans le tableau VIII montrent que le sulfate d'ammonium favorise très nettement la croissance de la *Torula* et du *Saccharomyces*; le poids des colonies est deux fois plus élevé que dans l'essai témoin (tableau VII). Elles indiquent également que ce sel ammoniacal contribue au développement de la *Monilia variabilis* mais qu'il est sans action sur le *Mycoderma*. (Voir tableau VIII.)

Influence de l'azote organique :

En dehors de l'azote ammoniacal proprement dit, les milieux de fermentations peuvent contenir de l'azote

TABLEAU VIII

INFLUENCE DE L'AZOTE AMMONIACAL

Conditions expérimentales :

Volume de bouillon	100 cc.
Sulfate d'Ammonium	6,6 gr. 0/100.
Teneur en azote ammoniacal	0,7 0/100.
Durée d'incubation	15 jours.
Température.....	20-22° C.

Levures ensemencées	EXAMEN MACROSCOPIQUE			EXAMEN MICROSCOPIQUE	Poids de la culture, après dessiccation, en milligrammes
	du dépôt végétatif	du voile	du milieu		
Torula.	Dépôt blanc un peu plus abondant que dans l'essai témoin.	Extrême- ment léger.	Troublé.	Rien de particulier ; nom- breuses cellules.	35
Saccharo- myces.	Dépôt jau- nâtre assez abondant.	Inexistant.	Transpa- rent.	Très nombreuses cellu- les. Milieu très favo- rable.	17,9
Monilia.	Dépôt blanc.	Extrême- ment léger.	Clair.	Forme levurienne à cel- lules rondes normales.	32,5
Mycoderme.	Léger dépôt blanc.	Impercep- tible.	Transpa- rent.	Culture moyenne ; rela- tivement beaucoup de cellules.	26,3

organique associé à différents groupements fonctionnels. Aussi est-il intéressant d'étudier le rôle que peuvent jouer, dans un milieu de culture, des substances comme l'eau de touraillons, la maltopeptone, le glycolle, l'acide aspartique, l'asparagine et la pipérazine. A cet effet, nous préparons une série de bouillons de culture, chacune de ces substances étant employée dans des proportions telles que la teneur en azote reste constante et égale à 0 gr. 7 0/100.

a) *Eau de touraillons* :

En ajoutant 50 gr. de touraillons au milieu de culture minéral sucré dont nous avons précédemment indiqué la composition, nous obtenons, après infusion et filtration, un bouillon contenant 0 gr. 7 0/00 d'azote organique. L'expérience montre que la solution ainsi obtenue constitue un aliment excellent pour les quatre espèces microbiennes qui font l'objet de cette étude. En effet, la colonie *Torula* est devenue 42 fois plus dense que celle que l'on obtient dans un liquide de même composition mais exempt d'azote. Les colonies de *Monilia* et de *Mycoderma* sont 25 fois plus importantes, tandis que l'accroissement du *Saccharomyces* n'a que doublé. Ces résultats sont consignés dans le tableau IX (page 52).

b) *Maltopeptone* :

La maltopeptone qui sert à la préparation des milieux ordinaires pour levures renferme environ 23,8 % d'azote titré par la *méthode de Kjeldahl*. Pour avoir un litre de bouillon à 0,7 0/00 d'azote, nous lui ajoutons 29,5 cc. d'une solution de maltopeptone à 10 %. Les ensemencements effectués dans ce bouillon montrent que la maltopeptone, bien que d'une valeur nutritive inférieure à celle de l'eau de touraillons, est néanmoins très favorable à nos quatre levures. Les poids de colonies recueillis sont effectivement trois fois plus grands que dans l'essai témoin représenté dans le tableau VII. On peut remarquer cependant que l'amélioration due à la maltopeptone est moins sensible sur le *Mycoderme* que sur les trois autres espèces. (Voir tableau X.)

TABLEAU IX
ENSEMENCEMENT OPÉRÉ SUR UN MILIEU DE TOURAILLONS

Conditions expérimentales :

Volume de bouillon	100 cc.
Teneur en azote organique	0,7 o/oo
Température.....	20-22° C.
Durée d'incubation	15 jours.

Levures ensemencées	EXAMEN MACROSCOPIQUE			EXAMEN MICROSCOPIQUE	Poids de la culture après dessiccation, en milligrammes
	du dépôt végétatif	du voile	du milieu		
Torula.	Extrême- ment abondant, d'une teinte crème.	Très léger.	Absolument troublé.	Cellules extrêmement nombreuses, filles et mères.	703,8
Saccharo- myces.	Très abon- dant pour un Saccha- romycés.	Inexistant.	Clair.	Très nombreuses cellules	100,3
Monilia.	Extrême- ment abondant.	Extrême- ment léger.	Très troublé.	Très nombreuses cellu- les des deux formes ; culture typique de la Monilia Variabilis lors- qu'elle se trouve ense- mençée dans un milieu très favorable.	531,5
Mycoderme.	Extrême- ment abondant.	Important à forme my- codermique	Absolument troublé.	Cellules très nombreuses,	632

Nous avons pu observer, d'autre part, que si l'on augmente la proportion de maltopeptone dans le bouillon jusqu'à atteindre le chiffre de 3,6 o/oo de ce corps, on parvient à obtenir sensiblement la même flore microbienne qu'avec l'eau de touraillons à 0,7 o/oo d'azote.

c) Glycocolle :

Le glycocolle, $\text{CH}_2 - \text{COOH}$, incorporé dans le bouil-
 NH_2

TABLEAU X

ENSEMENCEMENT OPÉRÉ SUR UN MILIEU RENFERMANT
DE LA MALTOPEPTONE

Conditions expérimentales :

Volume de bouillon	100 cc.
Maltopeptone, 1 ^{er} essai	2,95 o/oo.
— 2 ^e essai	15 o/oo.
Teneur en azote organique, 1 ^{er} essai	0,7 o/oo.
— 2 ^e essai	3,6 o/oo.
Durée d'incubation, 1 ^{er} essai	15 jours.
— 2 ^e essai	20 jours.
Température	20-22° C.

Levures ensemencées	EXAMEN MACROSCOPIQUE			EXAMEN MICROSCOPIQUE	Poids de la culture après dessiccation en milligrammes	
	du dépôt végétatif	du voile	du milieu		1 ^{er} essai	2 ^e essai
Torula.	Abondant.	Extrême- ment léger.	Très troublé.	Nombreuses cellules ron- des ; les cellules mères sont formées de zones concentriques à la pé- riphérie desquelles on aperçoit des cellules filles rondes tout au- tour de la dernière zone.	207	819
Saccharo- myces.	Abondant pour cette levure.	Inexistant.	Transpa- rent.	Cellules nombreuses, re- lativement grosses, ayant une grosse va- cuole occupant pres- que toute la cellule.	38	52
Monilia.	Très abon- dant, blanc	Très léger.	Troublé.	Très nombreuses cellules à forme lévurienne ; par endroits on aper- çoit de longs filaments désarticulés, mais on ne voit pas nettement la forme mycélienne caractéristique.	166	634
Mycoderme	Abondant.	Léger voile mycoder- mique.	Très troublé.	Nombreuses cellules, rien de particulier.	156	711

lon de culture à raison de 3 gr. 75 pour 1000 cc. exerce une action analogue à celle du sulfate d'ammonium. Comparativement aux essais témoins, les cultures de *Torula*, de *Monilia* et de *Saccharomyces* sont doublées, tandis que le développement du *Mycoderme* devient trois fois plus important. (Voir tableau XI.)

TABLEAU XI
ENSEMENCEMENT OPÉRÉ SUR UN MILIEU RENFERMANT DU GLYCOCOLLE
Conditions expérimentales

Volume de bouillon	100 cc.
Poids de glycolle.	3,75 ‰.
Teneur en azote organique	0,7 ‰.
Température.....	22-22° C.
Durée d'incubation	15 jours.

Levures ensemencées	EXAMEN MACROSCOPIQUE			EXAMEN MICROSCOPIQUE	Poids de la culture, après dessication, en milligrammes
	du dépôt végétatif	du voile	du milieu		
<i>Torula</i> .	Très léger dépôt adhé- rent aux pa- rois du bal- lon.	Inexistant.	Clair.	Nombreuses cellules.	28,7
<i>Saccharo- myces</i> .	Léger dépôt.	Inexistant.	Limpide.	Nombreuses cellules.	19,5
<i>Monilia</i> .	Léger dépôt blanc en suspension.	Impercep- tible.	Légèrement troublé.	Nombreuses cellules ron- des parmi lesquelles de grandes cellules mères.	46,7
<i>Mycoderme</i> .	Léger dépôt.	Très léger.	Clair.	Rien de particulier ; très nombreuses cellules.	71,5

d) *Acide anthranilique* :

L'acide anthranilique, ou acide ortho-amino-benzoïque

$$\text{C}^6\text{H}^4 \begin{cases} \text{COOH} \\ \text{NH}^2 \end{cases}$$
 est employé dans la proportion de
 6 gr. 85 par litre de bouillon. Les résultats obtenus avec
 ce composé (tableau XII) montrent qu'il ralentit nettement

le développement du *Mycoderme* mais qu'il favorise la pousse des trois autres espèces. En particulier il est à remarquer que les cultures de *Torula*, de *Monilia* et de *Saccharomyces* sont trois fois plus denses que dans le milieu au glycolle. Si l'on considère la différence dans la constitution chimique de ces deux acides aminés, on

TABLEAU XII

ENSEMENCEMENT OPÉRÉ SUR UN MILIEU RENFERMANT 6,85 gr. PAR LITRE D'ACIDE ANTHRANILIQUE

Conditions expérimentales :

Volume de bouillon	100 cc.
Acide anthranilique	6,85 ‰.
Teneur en azote organique	0,7 ‰.
Température.....	15 jours.
Durée d'incubation	20-22° C.

Levures ensemencées	EXAMEN MACROSCOPIQUE			EXAMEN MICROSCOPIQUE	Poids de la culture après dessiccation, en milligrammes
	du dépôt végétatif	du voile	du milieu		
Torula.	Léger dépôt brun foncé, adhérent aux parois du ballon.	Inexistant.	Très troublé, surface don- nant l'im- pression d'être huileuse.	Nombreuses cellules.	55
Saccharo- myces.	Léger, brun foncé, adhérent.	Inexistant.	Légèrement troublé, sur- face présen- tant un as- pect huileux.	Nombreuses cellules.	25
Monilia.	Léger, brun foncé	Inexistant.	Légèrement troublé, surface à l'aspect huileux.	Forme levurienne seule.	102
Mycoderme.	Très léger dépôt brun.	Inexistant.	Légèrement troublé, surface à l'aspect huileux.	Très peu de cellules, rien de particulier.	21

peut supposer que la présence d'un noyau benzénique joue un rôle effectif en faveur du développement des trois levures précitées. Toutefois nous n'avons pas pu établir si cette action devait être attribuée aux doubles liaisons qui rendraient le noyau plus facilement attaquant et, par suite, plus facilement assimilable par les levures, ou bien à l'apport d'une quantité plus grande de carbone et d'hydrogène dans le milieu de culture. (Voir tableau XII.)

e) *Acide amino-propionique* :

Cet acide, que l'on dénomme également l'alanine, $\text{CH}^3 - \underset{\text{NH}^2}{\text{CH}} - \text{COOH}$, est un acide aminé très voisin du

glycocolle, dont il ne diffère que par un radical méthyl $-\text{CH}^3$. Employé à raison de 4 gr. 25 par litre de bouillon de culture, ce qui représente, comme dans tous les essais précédents, une teneur en azote de 0,7 0/00, l'acide amino-propionique exerce une action très nette sur la croissance microbienne. Cette action est très favorable au développement de la *Torula*, du *Saccharomyces* et de la *Monilia*, mais un peu moins efficace vis-à-vis du *Mycoderme*. (Voir tableau XIII.)

Si l'on compare ces derniers résultats avec ceux qui ont été obtenus précédemment avec le glycocolle, on constate que l'acide aminé le plus riche en carbone et en hydrogène est précisément celui qui convient le mieux aux trois premières espèces mentionnées sur le tableau. Le *Mycoderme*, au contraire, semble s'accommoder d'un milieu moins riche en carbone.

TABLEAU XIII

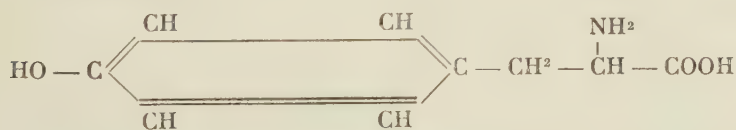
ENSEMENCEMENT OPÉRÉ EN PRÉSENCE D'ACIDE AMINO-PROPIONIQUE

Conditions expérimentales :

Volume de bouillon	100 cc.
Acide ortho-amino-propionique.....	4,25 ‰.
Teneur en azote organique	0,7 ‰.
Durée d'incubation	15 jours.
Température.....	20-22° C.

Levures ensemencées	EXAMEN MACROSCOPIQUE			EXAMEN MICROSCOPIQUE	Poids de la culture, après dessication, en milligrammes
	du dépôt végétatif	du voile	du milieu		
Torula	Très léger dépôt blanc très adhérent	Inexistant.	Clair.	Nombreuses cellules.	44,5
Saccharo- myces.	Léger dépôt blanc.	Inexistant.	Transpa- rent.	Nombreuses cellules.	24,7
Monilia.	Dépôt assez abondant, blanc.	Extrême- ment léger.	Légèrement troublé.	Très nombreuses cellu- les des deux formes ; forme mycélienne ne se présentant que sous l'aspect de filaments relativement courts, 4 cellules au plus et gé- néralement en voie de désarticulation.	51,8
Mycoderme.	Léger dépôt	Inexistant.	Clair.	Nombreuses cellules.	37

f) Tyrosine :



On peut s'attendre à ce que la tyrosine exerce une action spéciale sur les cultures microbiennes en raison de sa constitution chimique particulière. Cet acide aminé renferme en effet un noyau phénolique et l'on sait que d'une manière générale l'hydroxyle—OH des phénols

confère aux composés organiques un certain pouvoir antiseptique. Les résultats obtenus et consignés dans le tableau XIV nous ont confirmé ces précisions ; toutes les cultures sont effectivement inférieures à celles qui ont été observées en présence d'alanine. (Voir tableau XIV.)

TABLEAU XIV
ENSEMENCEMENT EN PRÉSENCE DE TYROSINE

Conditions expérimentales *

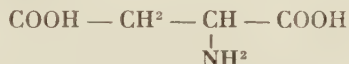
Volume de bouillon	100 cc.
Tyrosine	0,05 gr. o/oo.
Teneur en azote organique	0,7 o/oo.
Durée d'incubation	15 jours.
Température.....	20-22° C.

Levures ensemencées	EXAMEN MACROSCOPIQUE	EXAMEN MICROSCOPIQUE	Poids de la culture après dessiccation, en milligrammes
Torula.	Bouillon très épais, presque visqueux dans lequel la tyrosine semble avoir cristallisé.		3
Saccharomyces.	d°		7
Monilia.	Dans les milieux ensemencés avec la Monilia et le Mycoderme, on aperçoit des taches blanches mates à la surface, pouvant très bien être le début d'un voile.	Cellules extrêmement rares ; seule la tyrosine apparaît sous la forme de cristaux cylindriques semblant creux.	6
Mycoderme.	Pas de végétation ou, pour oe moins, extrêmement faible.		19

Nous croyons devoir faire remarquer d'autre part que l'emploi de la tyrosine donne lieu à de sérieuses difficultés d'ordre technique. Ce composé possède un poids moléculaire assez élevé, et doit, pour une même teneur en azote, être employé en assez grande quantité. Comme d'autre part sa densité et sa solubilité sont plutôt faibles, il en résulte que le milieu de culture additionné

de tyrosine se présente avec un aspect pâteux qui gêne considérablement les observations. Au bout de la période normale d'incubation, l'examen macroscopique était pratiquement impossible, tandis que la présence de cristaux d'acide aminé ne nous permettait pas d'examiner convenablement les colonies au microscope. Nous sommes cependant parvenus à nous débarrasser de ces cristaux et à effectuer les déterminations d'ordre quantitatif en procédant à des lavages au mélange éther-alcool ou bien à l'aide de solutions faiblement ammoniacales (5 % d'ammoniaque à 18° Bé). Mais il est très difficile, dans ces conditions, d'éliminer tout l'excédent de tyrosine sans perdre en même temps une partie plus ou moins importante de la colonie que l'on se propose de peser.

g) *Acide aspartique* :



L'étude de ce composé nous intéresse dans la mesure où elle peut nous fournir quelques indications sur l'influence éventuelle de la présence d'un second groupement fonctionnel acide dans une molécule organique. Il suffit de comparer les résultats inscrits dans les tableaux X, XIII et XIV pour constater que l'acide aspartique, l'alanine et la tyrosine exercent des actions nettement différentes. Il apparaît tout d'abord que, d'une manière générale, l'alanine composé mono-acide permet de meilleures pousses que l'acide aspartique. Ceci est dû à ce que, pour une même concentration moléculaire, l'acide bi-basique réalise une acidité effective nettement plus accusée que celle que donne un acide monobasique.

Cette acidité se trouve être trop forte pour la plupart de nos espèces à l'exception toutefois de la *Torula* qui, elle, au contraire, s'accommode d'une réaction acide nette.

D'autre part ces essais montrent aussi que le groupement fonctionnel phénol de la tyrosine s'oppose nettement à la croissance des microorganismes ensemencés. (Voir tableau XV.)

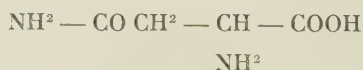
TABLEAU XV
ENSEMENCEMENT OPÉRÉ SUR UN MILIEU RENFERMANT
DE L'ACIDE ASPARTIQUE.

Conditions expérimentales :

Volume de bouillon	100 cc.
Acide aspartique	6,65 gr. ‰.
Durée d'incubation	15 jours.
Teneur en azote organique.....	0,7 ‰.
Température.....	20-22° C.

Levures ensemencées	EXAMEN MACROSCOPIQUE			EXAMEN MICROSCOPIQUE	Poids de la culture après dessiccation, en milligrammes
	du dépôt végétatif	du voile	du milieu		
<i>Torula</i> .	Assez abondant, blanc.	Imperceptible.	Légèrement troublé.	Très nombreuses cellules.	51,7
<i>Saccharomyces</i> .	Très léger.	Inexistant.	Clair.	Nombreuses cellules.	20
<i>Monilia</i> .	Léger, blanc	Imperceptible.	Clair.	Nombreuses cellules, à forme levurienne.	32
<i>Mycoderme</i> .	Très léger.	Inexistant.	Clair.	Nombreuses cellules.	29

h) *Asparagine* :



Cet acide est une forme amide de l'acide aspartique (acide β amide-amino succinique) ; l'essai de ce produit doit nous fournir quelques indications sur l'influence du remplacement d'un groupement fonctionnel acide par le

groupement amidé —CO—NH^2 . De plus, en nous reportant aux essais antérieurs dont les résultats figurent dans les tableaux VII, XIII, XIV et XV, nous pouvons observer que :

1° Le groupement amidé est très favorable au développement du *Mycoderme* ; effectivement la culture est devenue trois fois plus importante que dans le milieu contenant de l'alanine.

TABLEAU XVI

ENSEMENCEMENT OPÉRÉ SUR UN MILIEU RENFERMANT DE L'ASPARAGINE

Conditions expérimentales :

Volume de bouillon	100 cc.
Asparagine	6,64 gr. o/100.
Teneur en azote organique	0,7 o/100.
Durée d'incubation	15 jours.
Température.....	20-22° C.

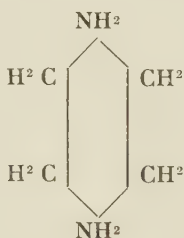
Levures ensemencées	EXAMEN MACROSCOPIQUE			EXAMEN MICROSCOPIQUE	Poids de la culture après dessiccation, en milligrammes
	du dépôt végétatif	du voile	du milieu		
Torula.	Assez abondant, blanc adhérent aux parois.	Inexistant.	Clair au repos.	Quelques cellules.	42
Saccharomyces.	Léger dépôt.	Inexistant.	Transparent.	Quelques cellules.	29
Monilia.	Léger, blanc	Inexistant.	Clair.	Cellules rondes assez nombreuses soudées les unes aux autres.	37
Mycoderme.	Léger dépôt.	Pas de voile continu, mais de petites taches ressemblant à des îlots non reliés les uns aux autres.	Transparent.	Très nombreuses cellules.	89

2° Le groupement amidé —CO—NH^2 est défavorable à la *Monilia*; le retard dans la pousse est à peu près le même que celui que l'on observe avec l'acide aspartique. En d'autres termes, partant de l'alanine $\text{CH}^3\text{—CH—COOH}$,
 NH^2

il semble que le remplacement d'un atome d'hydrogène par le groupement fonctionnel acide —COOH , ou bien par le groupement amide —CO—NH^2 modifie les propriétés nutritives dans le même sens.

3° La présence d'asparagine dans le bouillon de culture ne favorise nullement le développement de la *Torula*; nous croyons pouvoir attribuer ce fait à ce que le groupement fonctionnel amidé n'est pas de nature à modifier l'acidité du milieu dans le sens qui conviendrait à cette levure. (Voir tableau XVI.)

i) *Pipérazine* :



Incorporée au milieu de culture dans la proportion de 4 gr. 4 par litre, la pipérazine se comporte comme un antiseptique plus efficace que la tyrosine. (Voir tableau XVII.)

Influence de la nature de l'aliment sucré :

Nous nous sommes proposé d'étudier successivement l'action du saccharose et celle des deux monoses qui

TABLEAU XVII

ENSEMENCEMENT SUR UN MILIEU RENFERMANT DE LA PIPERAZINE

Conditions expérimentales :

Volume de bouillon	100 cc.
Pipérazine.....	4,4 gr. $\frac{0}{100}$.
Teneur en azote organique	0,7 $\frac{0}{100}$.
Durée d'incubation	15 jours.
Température.....	20-22° C.

Levures ensemencées	EXAMEN MACROSCOPIQUE			EXAMEN MICROSCOPIQUE	Poids de la culture, après dessiccation, en milligrammes
	du dépôt végétatif	du voile	du milieu		
Torula.	Absolu- ment nul.	Inexistant.	Transpa- rent.	Peu de cellules.	7,5
Saccharo- myces.	Absolu- ment nul.	Inexistant.	Transpa- rent.	Peu de cellules.	Impondérable trop faible.
Monilia.	Extrême- ment léger.	Inexistant.	Transpa- rent.	De très rares cellules à forme levurienne.	11
Mycoderme.	Ballon cassé accidentellement, donc annulé				

entrent dans sa composition, à savoir le glucose et le fructose. Dans ce but, nous préparons deux litres de bouillon renfermant :

2 gr.	de chlorure de potassium,
1 gr.	de chlorure de sodium,
0 gr. 5	de silicate de soude,
2 gr.	de sulfate d'ammonium,
0 gr. 05	de sulfate ferreux,
0 gr. 05	de sulfate de zinc,
1000 cc.	d'eau distillée.

On peut se rendre compte que les principaux constituants minéraux restent les mêmes que dans les bouillons qui ont servi aux études antérieures. La liqueur ainsi obtenue est alors partagée en quatre portions de 500 cc. auxquelles nous ajoutons respectivement :

a) 10 % de saccharose pur (sucre candi) ;

- b) 5 % de fructose pur Poulenc et 5 % de glucose pur cristallisé ;
 c) 10 % de glucose pur cristallisé Poulenc ;
 d) 10 % de fructose pur cristallisé Poulenc.

Tous ces milieux sont portés à la stérilisation et utilisés pour des ensemencements dans des conditions identiques ainsi que l'indiquent les tableaux XVIII, XIX, XX et XXI, pages 64, 65 et 66.

Nous voyons par ces différents essais que le saccharose donne, d'une façon générale, des pousses plus abondantes que les autres sucres. Ce biose se révèle à ce point de vue nettement supérieur au glucose et au fructose et même supérieur à un mélange équimoléculaire de ces deux derniers monoses qui ne sont cependant pas autre chose que le produit de l'intervention du saccharose.

TABLEAU XVIII
 ETUDE DE L'INFLUENCE DU SACCHAROSE

Conditions expérimentales :

Volume de bouillon	100 cc.
Teneur en saccharose	10 %
Durée d'incubation	20 jours.
Température.....	20-22° C.

Levures ensemencées	EXAMEN MACROSCOPIQUE			EXAMEN MICROSCOPIQUE	Poids de la culture après dessiccation, en milligrammes
	du dépôt végétatif	du voile	du milieu		
Torula.	Abondant.	Extrême- ment léger.	Troublé.	Peu de cellules ; pas de bourgeonnement.	129
Saccharo- myces.	Peu abon- dant.	Inexistant.	Limpide.	Nombreuses cellules.	19
Monilia.	Assez abon- dant.	Très léger.	Troublé.	Les deux formes sont visibles.	97
Mycoderme.	Peu abon- dant.	Inexistant.	Très légère- ment troublé.	Nombreuses cellules por- tant un ou plusieurs bourgeoisements.	43

TABLEAU XIX

ÉTUDE DE L'INFLUENCE D'UN MÉLANGE ÉQUIMOLÉCULAIRE DE FRUCTOSE ET DE GLUCOSE

Conditions expérimentales :

Volume de bouillon	100 cc.
Teneur en fructose	5 %
Teneur en glucose	5 %.
Durée d'incubation	15 jours.
Température.....	22-22° C.

Levures ensemencées	EXAMEN MACROSCOPIQUE			EXAMEN MICROSCOPIQUE	Poids de la culture, après dessiccation, en milligrammes
	du dépôt végétatif	du voile	du milieu		
Torula.	Abondant.	Léger.	Troublé.	Très peu de cellules.	105
Saccharo- myces.	Très peu abondant.	Inexistant.	Clair.	Nombreuses cellules très petites.	25
Monilia.	Abondant.	Léger.	Troublé.	Forme levurienne prédo- minante.	85
Mycoderme.	Peu abon- dant.	Inexistant.	Légèrement troublé.	Nombreuses cellules.	37

TABLEAU XX

ÉTUDE DE L'INFLUENCE DU GLUCOSE

Conditions expérimentales :

Volume de bouillon	100 cc.
Teneur en glucose.....	10 %.
pH initial.....	6,2
Durée d'incubation	15 jours.
Température	20-22° C.

Levures ensemencées	EXAMEN MACROSCOPIQUE			EXAMEN MICROSCOPIQUE	pH après fermentation	Poids de la culture après dessiccation, en milligrammes
	du dépôt végétatif	du voile	du milieu			
Torula.	Abondant	Léger.	Troublé, plus brun.	Rien de particulier, peu de cellules.	2,65	80
Saccharo- myces.	Abondant	Inexistant	Limpide, plus brun.	Cellules arrondies, très nombreuses.	2,37	27
Monilia.	Assez abondant.	Très léger.	Troublé.	Peu de cellules, forme levurienne prédo- minante.	2,87	59
Mycoderme.	Très peu abondant.	Inexistant	Très légè- rement troublé.	Rien à signaler.	3,18	32

TABLEAU XXI
ÉTUDE DE L'INFLUENCE DU FRUCTOSE

Conditions expérimentales :

Volume de bouillon	100 cc.
Teneur en fructose	10 %.
Durée d'incubation	15 jours.
Température.....	20-22° C.

Levures ensemencées	EXAMEN MACROSCOPIQUE			EXAMEN MICROSCOPIQUE	Poids de la culture après dessication, en milligrammes
	du dépôt végétatif	du voile	du milieu		
Torula.	Peu abondant.	Très léger.	Troublé.	Nombreuses cellules.	90
Saccharo- myces.	Abondant.	Inexistant.	Limpide.	Très nombreuses cellules.	20
Monilia.	Abondant.	Léger	Troublé.	Deux formes en présence.	77
Mycoderme.	Abondant.	Inexistant.	Légèrement troublé.	Rien de particulier.	36

Influence de la réaction du milieu :

Le degré d'acidité ou d'alcalinité d'un milieu de culture, exprimé par sa valeur de pH, exerce une action très nette sur les phénomènes de fermentation. Il existe pour chaque espèce microbienne une zone optima pour son développement. Si au moment de l'ensemencement le pH du milieu s'écarte quelque peu de cette valeur convenable, les microorganismes travaillent généralement en premier lieu au rajustement de la réaction ; la fermentation ne prend toute son ampleur que lorsque ce premier résultat a été obtenu.

Dans cette étude nous avons expérimenté en présence de glucose de préférence au saccharose car ce dernier peut s'intervertir à un degré plus ou moins avancé suivant la valeur de l'acidité. Le pH du bouillon préparé suivant le mode qui a été décrit au paragraphe précé-

dent est de 6,2 ; par l'addition de quantités convenables d'acide chlorhydrique, il nous a été facile de l'abaisser successivement à 5,4 et 3,9. Nous avons donc réalisé ainsi trois séries d'essais, comportant chacune des cultures de *Torula*, de *Saccharomyces*, de *Monilia* et de *Mycoderme*. (Voir tableaux XX, XXII, XXIII, pages 65, 67 et 68.)

D'après ces résultats, nous voyons que quelle que soit l'acidité initiale du milieu de culture, la valeur du pH pour une même espèce est toujours ramenée à la même valeur au cours de la fermentation. Pour la *Torula*, cette valeur est voisine de 2,63 tandis que pour le *Saccharomyces*, la *Monilia* et le *Mycoderma*, les pH en fin de

TABLEAU XXII
ÉTUDE DE LA RÉACTION DU MILIEU
hH = 5,4

Conditions expérimentales :

Volume de bouillon	100 cc.
Durée d'incubation	15 jours
Température	20-22° C.

Levures ensemencées	EXAMEN MACROSCOPIQUE			EXAMEN MICROSCOPIQUE	pH après fermentation	Poids de la culture après dessication, en milligrammes
	du dépôt végétatif	du voile	du milieu			
<i>Torula</i> .	Abondant	Léger.	Nette- ment troublé.	Nombreuses cellules.	2,64	81
<i>Saccharo- myces</i> .	Assez abondant.	Inexistant	Limpide.	Cellules relativement grosses, groupées en amas.	2,46	12
<i>Monilia</i> .	Assez abondant.	Très léger	Troublé.	Présences des deux formes avec prédo- minance de la for- me lévurienne.	3,01	50
<i>Mycoderme</i> .	Très peu abondant.	Inexistant	Très légè- rement troublé.	Nombreuses cellules semblant s'être re- produites.	3,17	30

TABLEAU XXIII
ÉTUDE DE LA RÉACTION DU MILIEU
pH = 3,9

Conditions expérimentales :

Volume de bouillon 100 cc.
Durée d'incubation 15 jours.
Température 20-22° C.

Levures ensemencées	EXAMEN MACROSCOPIQUE			EXAMEN MICROSCOPIQUE	pH après fermentation	Poids de la culture après dessiccation en milligrammes
	du dépôt végétatif	du voile	du milieu			
Torula.	Abondant	Léger.	Troublé.	Très nombreuses cellules ; cellules mères ayant bourgeonné. Milieu très favorable à la reproduction.	2,62	115
Saccharomyces.	Très faible	Inexistant	Limpide.	Très peu de cellules, pas de bourgeonnement.	2,68	9,4
Monilia.	Assez abondant.	Très léger.	Troublé.	Les deux formes sont visibles.	2,86	45
Mycoderme.	Très peu abondant.	Inexistant	Très légèrement troublé.	Rien de particulier.	3,17	37

fermentation sont respectivement de 2,46, 2,90 et 3,17. Nous notons aussi que ce sont le *Saccharomyces* et la *Monilia* qui s'accommodent le mieux d'un pH acide faible, voisin de la neutralité, tandis que la *Torula* et le *Mycoderma* se développent rapidement lorsqu'ils sont ensemencés dans un milieu à pH 3,9. De ces quatre espèces c'est la *Torula* qui produit l'acidification la plus accentuée.

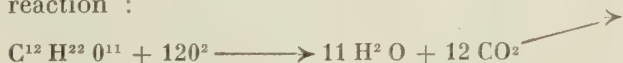
Nous constatons donc que l'ensemble de nos levures est favorable à un pH situé dans une zone acide faible comprise entre 5,5 et 4, et que les variations de ce pH n'ont que peu d'action sur l'importance des pousses.

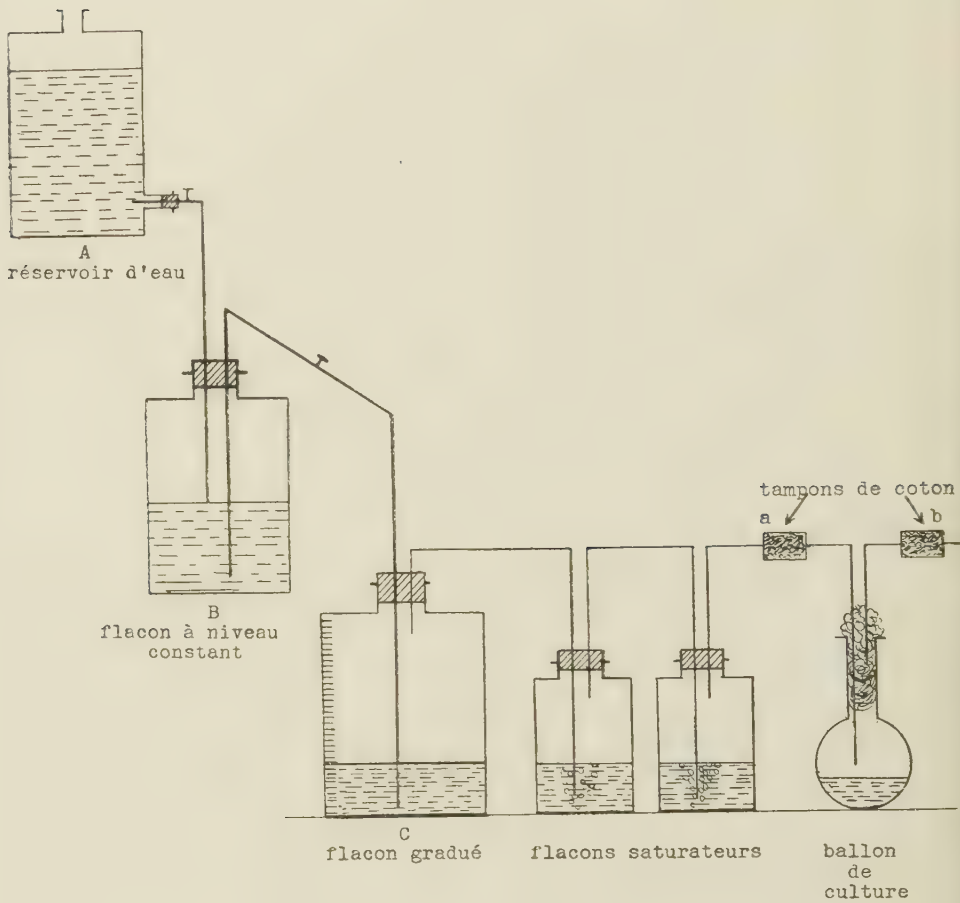
Influence d'une aération continue du milieu :

La croissance de nos microorganismes peut également être influencée par un renouvellement plus ou moins actif de l'air dans le milieu de culture et si, en particulier, on dispose les expériences de telle sorte que le bouillon de culture soit constamment traversé par un courant d'air, des variations pourront se produire non seulement parce que les microorganismes vont subir l'action spécifique d'un oxygène toujours renouvelé, mais aussi parce que l'entraînement par l'air des produits volatils de la fermentation (acide carbonique, alcools, aldéhydes, etc...) modifie très sensiblement la composition même du milieu.

Dans les essais se rapportant à cette étude, les cultures de *Torula*, *Monilia*, *Saccharomyces* et *Mycoderma* ont été soumises à l'action d'un courant d'air bactériologiquement pur, saturé d'humidité, et dont le débit était maintenu constant pendant toute la durée de l'incubation. Nos cultures ont été effectuées dans un ballon à deux tubulures « a » et « b » munies de tampons de coton filtrants, le tube « a » servant à l'admission d'un débit d'air constant préalablement saturé d'humidité par barbotage dans deux flacons contenant de l'eau distillée, l'air et les matières volatiles étant évacués par le tube « b ».

Dans le ballon de culture nous ensemençons 100 cc. d'un bouillon identique à celui qui a été précédemment utilisé dans l'étude de l'influence du saccharose ; ce bouillon contient 10 gr. de sucre candi. D'après l'équation de réaction :





on peut prévoir qu'un débit journalier de quatre litres d'air doit apporter le double de la quantité d'oxygène théoriquement nécessaire à la combustion de 10 gr. de saccharose.

Les observations et les résultats inscrits au tableau XXIV montrent que l'aération du milieu favorise la pousse de la *Monilia* mais que par contre elle diminue sensible-

ment celle de la *Torula*. Quant au *Saccharomyces* et au *Mycoderma*, ils ne semblent pas avoir été influencés. (Voir tableau XXIV.)

TABLEAU XXIV
ÉTUDE DE L'INFLUENCE DE L'AÉRATION DU MILIEU

Conditions expérimentales :

Volume de bouillon	100 cc.
Durée d'incubation	15 jours.
Température.....	20-22° C.

Levures ensemencées	EXAMEN MACROSCOPIQUE			EXAMEN MICROSCOPIQUE	Poids de la culture, après dessiccation, en milligrammes
	du dépôt végétatif	du voile	du milieu		
<i>Torula</i> .	Assez abondant.	Inexistant.	Troublé.	Peu de cellules, de très rars bourgeonne- ments.	93
<i>Saccharo- myces</i> .	Très peu abondant.	Inexistant.	Légèrement troublé.	Cellules réunies en amas. Rien de particulier.	18
<i>Monilia</i> .	Assez abondant.	Très léger.	Troublé.	Présence des deux formes	117
<i>Mycoderme</i> .	Très peu abondant.	Inexistant.	Très légèrement troublé.	Rien de particulier.	44

Influence des métaux lourds :

Il nous a paru intéressant d'étudier aussi, comparativement, l'influence du fer, du manganèse et du zinc sur la croissance de chacun des microorganismes que nous avons retirés des jusées. Pour cela, nous avons préparé un bouillon ayant la composition suivante :

Sucre candi	100 gr.
Chlorure de potassium.....	1 gr.
Chlorure de sodium.....	1 gr.
Silicate de soude.....	0 gr. 5
Sulfate d'ammonium	2 gr.
Eau	2000 gr.

Nous disposons

dans un premier ballon « A » :

320 cc. de bouillon plus 80 cc. d'une solution de sulfate ferreux à 2 gr. 5 0/00.

dans un second ballon « B » :

320 cc. de bouillon plus 80 cc. d'une solution de sulfate manganéux à 2 gr. 5 0/00.

dans un troisième ballon « C » :

320 cc. de bouillon plus 80 cc. d'une solution de sulfate de zinc à 2 gr. 5 0/00.

le quatrième ballon « D » de cette série contient 320 cc. de bouillon plus 80 cc. d'eau distillée.

Le contenu de chacun des ballons A, B, C, D étant ensuite subdivisé en quatre parts égales, nous obtenons finalement quatre prises d'essais de 100 cc. de milieu de culture additionné de sulfate ferreux, quatre prises d'essais semblables au sulfate de manganèse et au sulfate de zinc. Enfin la série comporte également quatre bouillons témoins exempts de sels de métaux lourds. Ceci nous a permis de cultiver dans des milieux différents les quatre microorganismes qui nous intéressent. Bien qu'il nous ait semblé que la fermentation ne progressait plus à partir du douzième jour, nous avons attendu le quinzième jour pour effectuer les observations microscopiques et les déterminations d'ordre quantitatif. A ce moment nous avons ajouté 2 cc. de chloroforme à chaque culture afin d'arrêter la multiplication des cellules et de prévenir les risques de pollution, puis nous avons filtré sur filtres Durieu préalablement équilibrés

TABLEAU XXV

INFLUENCE DES MÉTAUX SUR LE DÉVELOPPEMENT DE LA MONILIA VARIABILIS

Conditions expérimentales :

Volume de bouillon	100 cc.
Teneur en sulfate du métal lourd	0,05 o/oo
Durée d'incubation	15 jours.
Température.....	20-22° C.

Métal lourd étudié	EXAMEN MACROSCOPIQUE			EXAMEN MICROSCOPIQUE	Poids de la culture, après dessiccation, en milligrammes
	du dépôt végétatif	du milieu	du voile		
Fer.	Blanc, abondant, adhérent, au fond du ballon.	Troublé et décoloré.	Assez important, fragile par endroit. Voile formant des confettis blancs.	Deux formes : levurienne et mycélienne avec bourgeonnement latéral ; de nombreuses cellules.	156
Zinc.	Blanc, abondant, adhérent au fond du ballon.	Troublé, décoloré, mais moins qu'avec le fer.	Léger, discontinu, pas de confettis.	Rien de particulier ; deux formes : levurienne et mycélienne : mycelles très longs. Nombreuses cellules.	158
Manganèse.	Blanc, moins abondant que précédemment.	Troublé, à peine décoloré.	Aussi important qu'avec le fer, mais de nombreuses taches blanches ressemblant à la peau que forme le lait après ébullition.	Comme dans le cas du fer.	87
Essai témoin sans métal.	Abondant.	Légèrement troublé, pas décoloré.	Presque inexistant.	Absence presque totale de la forme mycélienne, forme levurienne prédominante avec des amas de cellules polyédriques.	130

sur la balance de précision. Les cellules ont été ensuite lavées sur filtre à trois reprises à l'eau distillée à 60° C.

et à l'alcool à 95°; ces lavages ont eu pour effet d'éliminer toutes traces de sucre et de sels minéraux. Il a suffi alors de sécher chaque filtre et son contenu à l'étuve à 80° C. jusqu'à poids constant, ce résultat s'obtenant généralement après trois heures de dessiccation.

Pour pouvoir déduire des poids ainsi trouvés la tare du filtre, nous avons effectué parallèlement les mêmes opérations de lavage et de dessiccation sur des filtres de même qualité et qui ont été préalablement équilibrés avec les filtres précédents sur la balance de précision.

Les résultats de ces expériences sont consignés dans les tableaux XXV, XXVI, XXVII et XXVIII, pages 73, 74, 75 et 76.

TABLEAU XXVI
INFLUENCE DES MÉTAUX SUR LE DÉVELOPPEMENT DE LA TORULA

Conditions expérimentales :

Volume de bouillon	100 cc.
Teneur en sulfate du métal lourd	0,05 o/oo.
Durée d'incubation	15 jours.
Température	20-22° C.

Métal lourd étudié	EXAMEN MACROSCOPIQUE			Poids de la culture après dessiccation, en milligrammes
	du dépôt végétatif	du milieu	du voile	
Fer.	Abondant dépôt blanc restant en suspension.	Nettement troublé.	Discontinu, léger.	111
Zinc.	Plus abondant que le précédent, également en suspension.	Nettement troublé.	Continu, plus important, ressemblant à une cristallisation.	154
Manganèse.	Nettement moins abondant que les précédents mais plus dense qu'en l'absence de tout métal.	Clair, non troublé.	Inexistant.	79
Essai témoin.	Très léger, le plus faible de tous.	Absolument clair.	Inexistant.	107

TABLEAU XXVII

INFLUENCE DES MÉTAUX SUR LE DÉVELOPPEMENT DU MYCODERME

Conditions expérimentales :

Volume de bouillon	100 cc.
Teneur en sulfate du métal lourd	0,05 ‰.
Durée d'incubation	15 jours.
Température	22-22° C.

Métal lourd étudié	EXAMEN MACROSCOPIQUE			EXAMEN MICROSCOPIQUE	Poids de la culture après dessiccation, en milligrammes
	du dépôt végétatif	du milieu	du voile		
Fer.	Léger dépôt, plus abondant cependant que s'il n'y a aucun métal.	Légèrement troublé.	Extrêmement léger, sensiblement inexistant.	Grosses cellules, peu nombreuses.	30
Zinc.	Très abondant, blanc, en suspension.	Très troublé.	Epais, blanc, continu, surface un peu gercée.	Petites cellules, extrêmement nombreuses.	139
Manganèse.	Très abondant, peut-être un peu moins qu'avec le zinc. Dépôt semblant plus lourd et restant peu en suspension.	Troublé, moins qu'avec le zinc.	Très épais, blanc, continu surface ridée, plissée comme une peau d'orange.	Comme pour le zinc.	130
Essai témoin.	Très léger dépôt.	Clair, pas troublé.	Inexistant.	Peu de cellules, mais très grosses.	40

D'après ce qui précède, la présence du sulfate ferreux et du sulfate de zinc contribue au développement de la *Monilia*, tout comme elle active d'ailleurs, d'une manière générale, la croissance de tous les aspergillés. Cette analogie dans les caractères de culture nous autorise, dans une certaine mesure, à considérer la *Monilia* comme une espèce intermédiaire entre les champignons inférieurs et les levures.

TABLEAU XXVIII
INFLUENCE DES MÉTAUX SUR LE DÉVELOPPEMENT DU SACCHAROMYCES
MARXIANUS

Conditions expérimentales :

Volume de bouillon	100 cc.
Teneur en sulfate du métal lourd	0,05 ‰.
Durée d'incubation	15 jours.
Température	20-22° C.

Métal lourd étudié	EXAMEN MACROSCOPIQUE			Poids de la culture après dessiccation, en milligrammes
	du dépôt végétatif	du milieu	du voile	
Fer.	Abondant ; particules blanches collées aux parois du ballon, dépôt brun au-dessus.	Transparent.	Inexistant.	40
Zinc.	Légèrement plus abondant qu'avec le fer, semblable aux autres points de vue.	Transparent.	Inexistant.	50
Manganèse.	Moins abondant qu'avec le zinc et le fer, plus abondant que s'il n'y a pas de métal.	Transparent.	Inexistant.	30
Essai témoin.	Le moins abondant de tous.	Transparent.	Inexistant.	27

Le sulfate de manganèse, au contraire, s'avère nettement nuisible.

Vis-à-vis de la *Torula*, nous notons une action efficace et bienfaisante du sulfate de zinc et une action sensiblement moindre du sulfate ferreux ; quant au sulfate manganoux, il entrave la pousse des colonies.

Les sulfates de fer et de zinc activent également, mais à des degrés différents, la vitalité des colonies de *Saccharomyces*, le sulfate de zinc se révélant, de beaucoup, le plus efficace. Quant au sulfate de manganèse, il ne paraît exercer aucune action sur ce microorganisme.

Enfin les cultures de *Mycoderme* présentent ce caractère particulier d'être activées par le sulfate de manganèse, sensiblement moins par le sulfate de zinc, alors qu'elles ne paraissent nullement influencées par le sulfate ferreux.

Dans le milieu de culture additionné de sulfate ferreux nous avons pu observer que le métal fer disparaît progressivement à mesure que les cellules microbiennes se multiplient. Dans les débuts de la période d'incubation, il est possible, en effet, de vérifier une réaction positive très nette lorsque l'on traite quelques centimètres cubes de bouillon par l'acide azotique et le sulfocyanure de potassium.

Après huit jours de culture, la coloration rouge devient beaucoup plus faible avec le milieu liquide, et si l'on sépare les cellules par filtration, on constate qu'elles ne donnent pas la réaction au sulfocyanure après broyage dans l'eau et l'acide azotique. La réaction redevient positive lorsque l'on incinère les cellules et que l'on reprend le test sur le résidu minéral. Ces observations nous permettent de conclure que le sulfate ferreux est un véritable aliment pour les microorganismes de la fermentation. Ceux-ci consomment le sel ferreux en vue de la confection de cellules nouvelles dans lesquelles le fer se trouve désormais engagé dans une combinaison organique complexe, et, de ce fait, masqué à ses réactifs habituels. Ce métabolisme du fer est particulièrement accentué dans les cultures de *Monilia*.

Pour résumer cette longue étude expérimentale relative à l'influence de différents facteurs : sels minéraux, substances organiques, conditions de pH, etc..., voici

exposés dans un tableau comparatif les résultats précédemment obtenus. (Voir tableau XXIX.)

Les signes + ou — indiquent que l'élément envisagé exerce une action favorable ou défavorable et les chiffres nantis du signe algébrique expriment en valeur absolue l'importance de la colonie obtenue par rapport à celle de l'essai témoin. On voit ainsi que dans le cas du touraillon d'orge la flore microbienne de *Torula* est deve-

TABLEAU XXIX
RÉSUMÉ DES RÉSULTATS OBTENUS DANS L'ÉTUDE PRÉCÉDENTE

ÉLÉMENTS ÉTUDIÉS	NATURE DES MICROORGANISMES			
	Torula	Saccharomyces	Monilia	Mycoderme
Anion nitrique	—3	+2	—3	—2
Anion phosphorique	—2	0	—3	+3
Cation magnésium	—4	+2	0	—1
Cation calcium.....	0	+2	+1	+3
Décoction de touraillons	+40	+11	+28	+30
Maltopeptone à 3 ‰	+12	+4	+7	+6
Sulfate d'ammonium.....	+2	+2	+1	0
Glycocolle	+2	+2	+2	+3
Acide anthranilique.....	+3	+3	+5	0
Alanine	+2	+3	+3	+1
Tyrosine	—1		0	
Acide aspartique	+3	+2	+1	0
Asparagine.....	+2	+3	+1	+3
Pipérasine	—2	antiseptique	—2	annulé
Saccharose (par rap. au Glucose)	+2	—1	+2	+1
Glucose (par rap. au Saccharose)	—2	+1	—2	—1
Fructose (par rap. au Saccharose).....	—1	0	0	0
Mélange équimoléculaire de Glucose + Fructose (par rap. au Saccharose).....	—1	+1	0	0
pH = 6,2 (par rap. à pH = 3,9)	—1	+3	+1	0
pH = 5,4 (par rap. à pH = 6,2)	0	—2	—1	0
pH = 3,9 (par rap. à pH = 6,2)	+1	—3	—1	0
Aération	—2	0	+1	0
Cation ferreux.....	0	+2	+1	+3
Cation zinc	+1	+2	+1	+3
Cation manganèse	—2	0	—2	+4

nue 40 fois plus dense que dans l'essai témoin, tandis que les cultures du *Saccharomyces*, de la *Monilia* et du *Mycoderme* sont devenues respectivement 11, 28 et 30 fois plus importantes.

Enfin, en ce qui concerne les sels minéraux, des déterminations complémentaires nous ont permis de fixer les conditions de concentration qui conviennent le mieux, à savoir :

Pour la Monilia :

8 ‰ de chlorure de calcium.

Pour le Mycoderme :

4 ‰ de chlorure de calcium,
2 ‰ de phosphate bipotassique,
2 ‰ de phosphate diammonique.

Pour le Saccharomyces :

2 ‰ de nitrate d'ammonium,
1 ‰ de chlorure ou de sulfate de magnésium,
8 ‰ de chlorure de calcium.

Quant à la *Torula* il ne semble pas que ses conditions de développement soient influencées par la présence des sels minéraux précités.

Choix des milieux les plus favorables :

Les observations précédentes nous permettent de fixer désormais la composition du milieu qui convient le mieux au développement de chacune des quatre levures retirées des jusées.

Pour la levure *Torula* on utilisera le milieu suivant :

Saccharose pur (sucre candi)...	100 gr.
Chlorure de potassium.....	2 gr.
Chlorure de sodium.....	1 gr.
Silicate de soude.....	0 gr. 5
Sulfate d'ammonium	2 gr.
Chlorure de calcium.....	4 gr.
Sulfate ferreux	0 gr. 05
Sulfate de zinc.....	0 gr. 05
Eau Q. S.....	1000 cc.

En fin de préparation, le pH du bouillon devra être, de préférence, porté à la valeur $\text{pH}=4$. D'autre part, nous rappelons que la levure *Torula* s'accommode fort bien de la présence des acides aminés, en particulier de l'acide aspartique à la concentration de 7 gr. par litre de bouillon.

Pour le genre *Saccharomyces*, on prépare le milieu suivant :

Saccharose pur (sucre candi)...	100 gr.
Chlorure de potassium.....	2 gr.
Chlorure de sodium.....	1 gr.
Silicate de Soude.....	0 gr. 5
Sulfate d'ammonium	2 gr.
Chlorure de calcium.....	8 gr.
Sulfate de fer.....	0 gr. 05
Sulfate de zinc.....	0 gr. 05
Nitrate d'ammonium	2 gr.
Phosph. d'ammonium $\text{PO}^4\text{H}(\text{NH}^4)^2$	2 gr.
Phosphate bipotassique $\text{PO}^4\text{H K}^2$	2 gr.
Sulfate de manganèse.....	1 gr.
Chlorure de magnésium.....	1 gr.
Eau Q. S.....	1000 cc.

Réaction de pH à obtenir (1) 6,2.

(1) Pour aboutir au pH voulu nous avons employé quelques gouttes d'une solution d'acide chlorhydrique pur.

Les meilleurs bouillons de culture pour les espèces genre *Monilia* et *Mycoderme* sont respectivement :

	Genre <i>Monilia</i>	Genre <i>Mycoderme</i>
Saccharose	100	100
Chlorure de potassium.....	2	2
Chlorure de sodium.....	1	1
Silicate de Soude.....	0,5	0,5
Sulfate d'ammonium	2	2
Sulfate de magnésie.....	1,5	»
Chlorure de magnésium.....	1,5	»
Chlorure de calcium.....	8	4
Phosphate d'ammonium (PO ⁴ H Am ²). ..	néant	2
Phosphate bipotassique	»	2
Sulfate de zinc.....	»	0,05
Sulfate ferreux	»	0,05
Eau Q. S.	1000 cc.	1000 cc.
Réaction de pH	pH = 6	4 ≤ pH ≤ 6

Nous avons vu, d'autre part, que les propriétés nutritives de ces milieux sucrés sont notablement accrues par l'addition de 15 o/oo de maltopeptone ou bien d'une décoction de touraillons à raison de 50 gr. par litre de bouillon. Dans le cas particulier du milieu pour *Mycoderme*, on peut aussi envisager l'addition d'un acide aminé, tel que l'asparagine dans la proportion de 7 o/oo. Enfin nous obtiendrons un milieu pouvant convenir en même temps aux quatre levures en dissolvant dans de l'eau et en amenant le volume à 1000 cm³.

Saccharose	100 gr.
Chlorure de sodium.....	1 gr.
Chlorure de potassium.....	2 gr.
Silicate de soude.....	0 gr. 5
Sulfate d'ammonium	2 gr.
Chlorure de calcium.....	4 gr.

Sulfate de zinc.....	0 gr. 05
Sulfate ferreux	0 gr. 05
Maltopeptone	15 gr.

ou bien :

Touraillons	50 gr.
-------------------	--------

Un tel bouillon de culture ne réalise sans doute pas le maximum de conditions de croissance pour chacune des quatre espèces, mais il se prête néanmoins fort bien à la culture de chacune d'elles. Etant donnée la simplicité qui en résulte au point de vue de la conduite des expériences, c'est ce milieu « *moyen* » que nous utiliserons dans les études ultérieures.

Pour contrôler la valeur nutritive de ce milieu, nous avons préparé 1200 cc. en supprimant toutefois maltopeptone et touraillons.

Nous les avons séparés en trois parties égales et nous avons opéré comme suit :

1° les premiers 400 cc. ont été répartis dans quatre ballons de 500 cc., chaque ballon contenant donc 100 cc. du milieu ;

2° à la deuxième partie, nous avons ajouté 18 cc. de maltopeptone, puis nous avons opéré comme ci-dessus ;

3° la troisième partie a été additionnée de 60 gr. de touraillons ; après ébullition et filtration, nous avons ramené le volume à 400 cc. par addition d'eau et nous avons opéré alors comme précédemment.

Nous avons ensuite stérilisé, puis ensemencé, avec chacune de nos levures, un ballon de chaque série.

Après quinze jours d'incubation, nous avons pesé nos

colonies et nous avons consigné les résultats dans le Tableau XXX.

TABLEAU XXX
VALEUR NUTRITIVE

Conditions expérimentales :

Volume de bouillon	100 cm ³
Durée de l'incubation.....	15 jours.
Température.....	20-21° C.
Volume de cultureensemencée	1 cm ³ .
1 ^{er} essai	sans maltopeptone ni touraillons.
2 ^e essai	15 o/oo de maltopeptone.
3 ^e essai	50 o/oo de touraillons.

Levures	Poids de la culture obtenue, exprimé en milligrammes		
	Premier essai	Deuxième essai	Troisième essai
Torula.	190	1300	1235
Saccharomyces.	55	165	210
Monilia.	160	830	770
Mycoderme.	85	940	880

L'examen de ce Tableau prouve que le milieu ainsi constitué est très favorable à nos levures, et qu'il permet d'obtenir des colonies importantes et une multiplication rapide des cellules.

CHAPITRE III

Action du Tanin sur les Microorganismes des Jusées

Les quatre espèces levuriennes que nous étudions peuvent vivre en présence de quantités assez importantes de tanin ; elles ont été en effet isolées sur des liqueurs de tannage végétal.

D'autre part, notre étude nous a permis de définir un milieu exempt de tanin sur lequel leur pousse est abondante.

Il nous a paru intéressant de déterminer :

1° Si la présence du tanin est favorable ou défavorable au développement de ces organismes et quel est l'effet produit sur lui par la concentration progressive en tanin.

2° Si la molécule de tanin est attaquée au cours du développement de ces levures (on sait que les moisissures vivent aux dépens du tanin qu'elles décomposent).

Ces constatations présentent un intérêt pratique, car si les microorganismes ne consomment que du sucre, ils peuvent être utiles en tannerie ; si au contraire ils consomment du tanin, ils seront d'autant plus nuisibles que cette consommation sera plus intense.

Nous n'avons envisagé, dans cette étude, qu'un seul tanin : celui de la noix de Galles ; c'est en effet le seul

tanin que l'on puisse préparer en un état de pureté relative. Nous pouvons considérer que les autres tanins du groupe des tanins pyrogalliques qui présentent avec l'acide gallotannique des analogies de composition certaines, se comportent de façon identique vis-à-vis des ferments ; d'autre part nous devons admettre que les tanins catéchiques ne sont pas fermentescibles.

A la fin du chapitre précédent, nous avons indiqué la composition d'un milieu de culture pour les microorganismes des jusées (voir page 81). Ce milieu contient 10 % de saccharose et des sels minéraux en proportions variables. Le sucre possédant, comme on l'a vu, des propriétés nutritives très accusées, nous l'excluons donc, momentanément, de la préparation du bouillon de culture, pour pouvoir vérifier, tout d'abord, si les microorganismes que nous étudions peuvent se développer dans un bouillon ne renfermant que des sels minéraux et du tanin œnologique. L'étude expérimentale de cette question comporte, d'une part, l'examen bactériologique des colonies microbiennes qui pourront être obtenues dans ces nouveaux milieux, d'autre part, une étude chimique, dans le but de rechercher si la molécule de tanin est réellement attaquée par les microorganismes de la fermentation.

Etude bactériologique :

Dans une première série d'expériences, nous utilisons un bouillon de culture minéral comprenant :

Chlorure de potassium.....	2 gr.
Chlorure de sodium.....	1 gr.
Silicate de sodium.....	0 gr. 5

Sulfate d'ammonium	2 gr.
Chlorure de calcium.....	4 gr.
Sulfate de zinc.....	0 gr. 05
Sulfate ferreux	0 gr. 05
Eau Q. S.....	1000 cc.

Nous prélevons quatre prises d'essai de 98 cc. auxquelles nous ajoutons 4 grammes de tanin à l'alcool, provenant de la Société Séciven à Botenay et contenant 85 % de tanin gallique.

Après stérilisation et refroidissement, le bouillon de culture se présente sous l'aspect d'un liquide roux, parfaitement limpide ; le tanin est complètement dissous. Nous remarquons, d'autre part, qu'il n'a pas subi la moindre hydrolyse pendant cette préparation, puisque le pouvoir réducteur du ballon témoin après défécation est voisin de zéro. Chaque essai est ensuiteensemencé avec 1 cm³ de culture pure prélevée dans un bouillon à la maltopeptone le cinquième jour de l'incubation, ce qui représente approximativement :

100 cc. de bouillonensemencé avec la levure <i>Monilia</i>	
100 cc. — — — — — <i>Torula</i>	
100 cc. — — — — — <i>Mycoderme</i>	
100 cc. — — — — — <i>Saccharomyces</i>	

Cette série comporte en outre un essai témoin qui n'est pasensemencé.

A l'examen macroscopique, nous constatons que, pendant les cinq premiers jours, les cultures de *Torula*, de *Saccharomyces*, de *Mycoderma* se troublent très légèrement. A partir du sixième et jusqu'au vingtième jour, le trouble ne paraît plus augmenter, ce qui semble indi-

quer que l'activité de la fermentation s'est notablement atténuée. Dans la culture de *Monilia*, nous notons la formation d'un voile entre le huitième et le seizième jour, et un état apparemment stationnaire pendant les jours suivants.

De l'examen microscopique, il ressort qu'après vingt jours d'incubation, les cultures ont atteint leur croissance maximum et ne se modifient plus sensiblement. Nous remarquons, en outre, que les cellules sont extrêmement rares et semblent ne s'être pas reproduites. Ce caractère est particulièrement accusé dans les cultures de *Saccharomyces*, de *Torula* et de *Mycoderme* ; quant à la *Monilia variabilis*, nous remarquons qu'elle se présente sous ses deux formes possibles de cellules, les formes levuriennes et mycéliennes.

Etude chimique :

Dans les essais que nous venons de décrire, chaque bouillon de culture contenait, au moment de l'ensemencement, 4 % de tanin. Si nous parvenons à doser le tanin qui subsiste après la fermentation, nous pourrions évaluer la quantité qui a été consommée par les microorganismes.

Dans les conditions particulières de nos expériences, il ne nous était guère possible d'appliquer les méthodes de dosage du tanin utilisant la poudre de peau. En effet, la méthode au filtre cloche tout comme la méthode officielle de l'Association Internationale des Chimistes de l'Industrie du Cuir, repose sur la détannisation d'une solution par la poudre de peau, la quantité de tanin étant représentée par la différence de poids entre l'extrait

sec avant détannisation et l'extract sec après détannisation. La dessiccation des résidus secs se faisant vers 95°-100° C., nous commettrions des erreurs appréciables en atteignant cette température, par suite de la perte de substances volatiles qui figurent dans la composition des bouillons de culture après fermentation. D'un autre côté, l'impossibilité de dessécher d'une manière absolue la poudre de peau ne nous a pas permis d'envisager un dosage par pesée de la poudre de peau sèche avant et après détannisation, l'augmentation de poids représentant le tanin fixé.

Pour toutes ces raisons, nous avons fixé notre choix sur une méthode de dosage volumétrique basée sur les propriétés réductrices des tanins. Cette méthode a nécessité, comme nous le verrons par la suite, une mise au point assez minutieuse, mais elle présentait, d'autre part, l'avantage d'être rapide. Elle a été conçue par MM. CASTEL et ASTRUC à l'Institut de Recherches Agronomiques (Station OEnologique de Bourgogne) et a été ensuite modifiée par M. COLLIER; c'est cette modification que nous avons appliquée.

Les liqueurs dans lesquelles on doit doser le tanin renferment toujours d'autres substances réductrices, en particulier des sucres réducteurs. La méthode de COLLIER consiste à déterminer le pouvoir réducteur total de la liqueur, puis le pouvoir réducteur de cette même liqueur débarrassée de son tanin; par différence, on obtient le pouvoir réducteur dû au tanin, dont l'importance donne une mesure de la quantité de tanin contenue dans la liqueur.

L'élimination du tanin peut être effectuée par une substance absorbante, telle que la poudre de peau (la méthode de dosage du tanin de LOWENTHAL utilise ce procédé) ou bien par précipitation à l'état de sel de zinc (méthode de SISLEY), ou bien enfin, comme dans la méthode de COLLIER, par défécation à l'acétate plombeux.

Le pouvoir réducteur peut être estimé par décoloration d'une liqueur de permanganate de potassium (méthode de LOWENTHAL et SISLEY), mais la fin du titrage est malaisée à fixer, et nous avons préféré le mode opératoire de CASTEL et ASTRUC, modifié par COLLIER, qui utilise la réduction d'un sel cuivrique, comme dans le dosage des sucres par la méthode bien connue de BERTRAND et THOMAS.

Le mode opératoire devient alors le suivant :

1° *Détermination du pouvoir réducteur direct et total :*

MM. CASTEL et ASTRUC (1) ayant envisagé d'appliquer au dosage du tanin la méthode de BERTRAND pour le dosage du sucre, se sont heurtés à de sérieuses difficultés que M. COLLIER (2) est parvenu à résoudre. Sans vouloir entrer dans le détail de cette étude, il ne nous paraît pas inutile cependant d'examiner succinctement les facteurs qui peuvent influencer sur les résultats du dosage au point de leur ôter toute signification. Ces facteurs

(1) CASTEL et ASTRUC, Le dosage pratique du tanin dans les vins. *Annales des falsifications*, 1932-1933, p. 477.

(2) COLLIER, Le dosage du tanin du vin. *Annales des falsifications*, 1934-1935, p. 208.

sont au nombre de quatre : la concentration de la liqueur à analyser, la durée de l'ébullition au moment du dosage, l'intensité de l'ébullition et la durée du dépôt de l'oxydure de cuivre.

Le facteur concentration a une grande importance du fait qu'il n'y a pas une proportionnalité directe entre le pouvoir réducteur de la solution et la quantité de substance réductrice dissoute. En mesurant directement et par différence le pouvoir réducteur de solutions renfermant des quantités variables, mais connues, de tanin, COLLIER a constaté que le pouvoir réducteur de 1 cc. de tanin était d'autant plus élevé que la richesse tannique de la solution est elle-même plus grande. Pour cette raison, l'auteur de la méthode estime qu'il est préférable d'exprimer le pouvoir réducteur du tanin contenu dans une solution en milligrammes de cuivre par litre plutôt que de l'exprimer en grammes de tanin. De plus cet auteur a également constaté que l'on obtenait une exactitude maximum en opérant avec des liqueurs de faible dilution contenant de 10 à 90 milligrammes de sucre réducteur par essai.

Pratiquement, nous avons constaté qu'il valait mieux resserrer ces limites entre 20 et 40 milligrammes.

Le pouvoir réducteur croît avec la durée et l'intensité de l'ébullition, des différences de l'ordre de 5 % pouvant être observées lorsque l'on fait varier ces deux facteurs. Pour éliminer cette cause d'erreur, COLLIER a adopté le mode opératoire que SAILLARD (1) conseille pour le dosage de petites quantités de sucre réducteur dans de grandes

(1) SAILLARD, *Betterave et sucrerie de betterave, dosage des sucres dans la saccharose*, pp. 133 et suivantes.

quantités de saccharose. Etant donné qu'il est plus facile de régler une température qu'une intensité d'ébullition, et que, d'autre part, l'erreur relative sur une mesure de temps est d'autant plus faible que ce temps est lui-même plus long, on chauffe le liquide à analyser au bain-marie à une température bien déterminée pendant un temps assez long. Nous avons pu nous rendre compte par expérience que l'on obtient des résultats suffisamment concordants en chauffant les solutions dans des fioles erlenmeyer sur une plaque chauffante de façon à maintenir une douce ébullition pendant trois minutes.

Enfin, en ce qui concerne l'influence de la durée du dépôt d'oxydule, nous avons remarqué que les meilleurs résultats sont obtenus lorsque cette durée est de huit minutes.

Toutes ces conditions expérimentales étant observées, on détermine en premier lieu le pouvoir réducteur direct et total de la solution ; nous conviendrons de l'exprimer en milligrammes de cuivre par litre et de le représenter par la lettre A.

2° Détermination du pouvoir réducteur après défécation :

En dehors du tanin proprement dit, les solutions à analyser contiennent généralement d'autres substances organiques réductrices qu'il est nécessaire de détruire avant de procéder à la défécation du tanin.

Dans ce but, LABORDE et COLLIER ont préconisé une oxydation des matières organiques en ajoutant peu à

peu au liquide une solution saturée de permanganate de potasse jusqu'à ce que la coloration rouge ait complètement viré au brun. Comme le virage se fait progressivement, les quantités de permanganate ajoutées peuvent varier très sensiblement avec l'opérateur.

En recherchant les conséquences que pourraient avoir ces variations, COLLIER a constaté que l'addition de permanganate déterminait une augmentation du pouvoir réducteur. Cette anomalie apparente s'explique si l'on considère que la réduction du permanganate par le tanin en milieu acide donne des sels manganeux qui sont réducteurs vis-à-vis de la liqueur cupro-alkaline. Par contre la décomposition du permanganate en milieu neutre donne du bioxyde de manganèse insoluble. On a donc tout avantage à effectuer l'oxydation permanganique en milieu acide très faible, voisin de la neutralité. En opérant sur des solutions très diluées, à 3 o/oo environ, dans lesquelles on peut considérer l'acidité comme étant nulle ou tout au moins insuffisante pour dissoudre l'oxyde de manganèse en sels manganeux, on évitera donc l'inconvénient qui vient d'être signalé.

L'oxydation permanganique étant réalisée, la suite du dosage comporte la défécation du tanin par précipitation à l'aide d'une solution saturée d'acétate de plomb. Dans cette opération il faut éviter un excès de réactif ; 5 cc. sont généralement suffisants ; on complète à 100 cc. avec de l'eau distillée ou avec une solution saturée de sulfate de soude et l'on mesure le pouvoir réducteur par la méthode de BERTRAND. On a ainsi un nombre B qui représente le pouvoir réducteur du liquide exempt

de tanin et que l'on exprime également en milligrammes de tanin par litre (1).

3° *Pouvoir réducteur du tanin pur :*

Nous déterminons d'autre part le pouvoir réducteur total d'une solution aqueuse à 2 o/oo de tanin œnologique sans oxydation ni défécation préalable. Nous obtenons ainsi un troisième nombre C que nous exprimons en milligrammes de cuivre par litre. Dès lors, la teneur en tanin, T, de la solution analysée par la méthode que nous venons de décrire est donnée par l'expression :

$$T = \frac{A - B}{C}$$

Mode opératoire :

Si nous avons une culture contenant 4 % de tanin par exemple, nous commençons par le diluer au 1/10^e en prélevant, au moyen d'une pipette, 20 cc. du bouillon à analyser que nous amenons à 200 cc. dans une fiole jaugée en ajoutant de l'eau distillée.

Puis nous prélevons très exactement au moyen d'une pipette un certain volume de cette liqueur au 1/10^e permettant de se trouver dans les limites prévues, soit pour un bouillon contenant 4 % de tanin, 5 cm³ que nous complétons à 20 cm³ par addition d'eau distillée.

(1) N. B. — Si l'on craint d'avoir employé un excès de réactif, on filtre le liquide, et l'on dose le pouvoir réducteur du filtrat ; le nombre trouvé est ensuite déduit du pouvoir réducteur B qui se trouve défini ultérieurement.

Nous le plaçons dans un erlenmeyer de 250 cm³ et nous ajoutons 20 cm³ d'une liqueur cuivrique ayant la composition suivante :

Sulfate de cuivre.....	40 gr.
Eau distillée Q. S.....	1000 cc.

puis 20 cm³ d'une liqueur sodique constituée par :

Sel de Seignette.....	200 gr.
Hydroxyde de sodium....	150 gr.
Eau Q. S.....	1000 cc.

Nous agitons et nous maintenons à l'ébullition trois minutes très exactement.

Après quoi, nous agitons à nouveau, nous inclinons l'erlenmeyer et nous laissons reposer huit minutes, nous filtrons, sans entraîner le précipité, sur un filtre en verre poreux n° 4 et sans aspirer trop fortement afin de ne pas coller les particules du Cu²O au filtre, nous lavons à l'eau bouillie chaude, puis nous entraînons le précipité sur le filtre sans insister.

Nous versons dans l'erlenmeyer 20 cm³ d'une liqueur ferrique, bouillie et tiède ayant la composition suivante :

Sulfate ferrique	50 gr.
Acide sulfurique	200 gr.
Eau Q. S.....	1000 cc.

et nous recevons dans une fiole à vide propre. Nous lavons l'erlenmeyer ainsi que le filtre et nous titrons enfin avec une liqueur de permanganate de potassium décinormale. Ce premier résultat nous indique le pouvoir réducteur direct et total de notre bouillon.

En ce qui concerne l'évaluation du pouvoir réducteur après défécation, nous opérons de la même façon, mais

avant d'ajouter l'acétate plombeux, nous pratiquons une oxydation permanganique des matières organiques en milieu très légèrement acide, voisin de la neutralité, obtenu au moyen de liqueurs très diluées de l'ordre de 3 o/oo. Nous ajoutons pour cela à l'erlenmeyer une solution saturée permanganique jusqu'à obtention d'une teinte brune. A ce moment, nous ajoutons 5 cm³ d'une solution saturée d'acétate plombeux et nous complétons à 100 cm³ avec une solution saturée de sulfate de sodium. Nous obtenons ainsi un précipité, nous filtrons et, finalement, nous dosons comme nous l'avons indiqué précédemment dans le cas de l'évaluation du pouvoir réducteur direct et total.

Pour que les tableaux dans lesquels nous résumerons les résultats trouvés soient clairement exposés, nous indiquerons l'expression des pouvoirs réducteurs que donne l'application du processus de dosage que nous venons de voir, à nos cultures avant et après fermentation.

Le dosage avant défécation, effectué après fermentation, nous donne le pouvoir réducteur direct et total représentant la somme des pouvoirs réducteurs des sels minéraux, de la culture microbienne, des aldéhydes ou autres composés organiques engendrés par la dégradation du tanin, et aussi du tanin non attaqué.

Le dosage effectué après défécation sur les mêmes bouillons fermentés nous donne la somme des pouvoirs réducteurs du milieu, de la culture, des aldéhydes ou autres corps non défécables résultant de la dégradation éventuelle du tanin par fermentation. La différence entre ces deux pouvoirs réducteurs totaux se rapporte au tanin qui n'a pas été consommé.

Grâce à des déterminations antérieures sur des milieux connus, nous pourrons convertir ces données en teneurs en tanin pour cent ; finalement, en retranchant les nombres ainsi trouvés du poids initial du tanin contenu dans le bouillon de culture, et dosé par le même procédé, nous trouverons la quantité de tanin qui aura pu disparaître au cours de la fermentation.

Enfin, lorsque la dégradation du milieu ne donne pas lieu à la formation de corps réducteurs à faible poids moléculaire, il suffit de comparer les pouvoirs réducteurs directs et totaux avant et après la fermentation pour obtenir immédiatement la valeur du tanin consommé.

De plus, dans la plupart des cas, nous verrons que si l'on compare les quantités de tanin consommé calculées par ces deux procédés, elles sont semblables, si évidemment on fait abstraction des faibles erreurs pratiques impossibles à éviter.

Le dosage du pouvoir réducteur total et du pouvoir réducteur après précipitation du tanin, dans un milieu stérilisé non ensemencé, doit nous permettre de nous rendre compte de l'hydrolyse possible du tanin pendant la stérilisation.

Enfin, ces mêmes déterminations effectuées dans un milieu identique, non stérilisé, nous permettent d'établir la proportionnalité qui existe entre le pouvoir réducteur d'un milieu, exprimé en cm^3 de permanganate de potassium N/10, et sa teneur en tanin.

Les données numériques se rapportant à l'étude bactériologique et chimique de la fermentation en présence

du tanin sont rassemblées dans le tableau XXXI. (Voir le tableau XXXI.)

L'examen des résultats exposés ci-dessus autorise quelques remarques et des conclusions qui nous paraissent présenter un certain intérêt :

1° Dans les bouillons de culture des levures *Saccharomyces*, *Torula* et *Mycoderma*, le pouvoir réducteur direct et total après fermentation diffère très peu de celui du témoin nonensemencé. Il n'y a donc pas eu attaque du tanin par les levures.

On peut même observer que le pouvoir réducteur est légèrement supérieur à celui du témoin, de 0,2 cc. à 0,5 cc. de solution $\text{Mn O}^{\text{K}} \text{N}/10$. Cette petite différence peut être due en partie au pouvoir réducteur de 1 cc. de culture microbienne employé pour l'ensemencement, et aux faibles écarts possibles dans l'appréciation du virage lors du titrage du permanganate. Ces divergences sont d'ailleurs négligeables lorsqu'on les rapporte au poids du tanin, puisqu'un volume de 11 cc. 1 de permanganate $\text{N}/10$ ne correspond qu'à 0 gr. 05 de tanin œnologique.

Le pouvoir réducteur de ces trois bouillons de culture, après défécation, est sensiblement nul. Cela prouve encore que tous les corps réducteurs inclus dans le milieu sont représentés par du tanin, dont la molécule n'a subi aucune dégradation.

L'acidité des milieux est la même avant et après la période d'incubation ; aucune fermentation donnant naissance à des composés acides ou basiques ne s'est donc produite.

TABLEAU XXXI

ÉTUDE CHIMIQUE ET BACTÉRIOLOGIQUE DE LA FERMENTATION EN PRÉSENCE DE TANIN

Conditions expérimentales :

Volume de bouillon	100 cc.
Teneur en tanin	4 %
Durée de l'incubation.....	20 jours.
Température.....	20-22° C.
Quantité de bouillon analysé	1 cm ³
Ensemencement effectué avec	1 cm ³ de culture

LEVURES ensemencées	pH du milieu		Pouvoir réducteur direct et total		Pouvoir réducteur après défécation		Proportion de tanin		EXAMEN MACROSCOPIQUE			EXAMEN MICROSCOPIQUE G = 300 diam.
	avant fermen- tation	après fermen- tation	exprimé en cm ³ de Mn O ⁴ K N/10 avant après fermentation		exprimé en cm ³ de Mn O ⁴ K N/10 avant après fermentation		Consommé en tanin	exprimé en % par rapport au tanin initial	du dépôt végétatif	du voile du milieu	du milieu	
Monilia	3,8	3,7	8,8	7,3	0,1	0,1	0,0067	17	Assez abondant.	Léger, n'ap- paraît qu'à partir du 15 ^e jour.	Troublé.	Peu de cellules ; les deux formes sont en présence. La co- lonie semble ne pas s'être reproduite.
Mycoderme.	3,8	3,7	8,8	9	0,1	0,05	0	0	Assez abondant.	Inexistant.	Troublé ; dé- pôt en suspension.	Très peu de cellules
Torula.	3,8	3,7	8,8	9,3	0,1	0,1	0	0	Léger dépôt.	Inexistant.	Légèrement troublé.	Egalement peu de cellules.
Saccharomyces.	3,8	3,8	8,8	9,1	0,1	0,1	0	0	Léger dépôt.	Inexistant.	Légèrement troublé.	Peu de cellules de forme arrondie pré- dominante.

A l'examen macroscopique, on a pu observer un trouble plus ou moins apparent, et à l'examen microscopique, déceler quelques cellules. Cela s'explique en raison du fait que les ensemencements ont été effectués d'une manière assez massive avec 1 cc. d'une culture microbienne en pleine activité. Quoique placées dans des conditions défavorables, quelques cellules ont continué à végéter et cela a suffi pour troubler plus ou moins le bouillon.

En définitive, on peut considérer que les espèces *Saccharomyces*, *Torula* et *Mycoderma* ne manifestent aucune vitalité dans un milieu qui ne contiendrait que des sels minéraux et du tanin.

2° Dans les milieux de culture de *Monilia*, le pouvoir direct et total avant fermentation correspond à 8,8 cc. de solution Mn O⁴K N/10, et après fermentation, à 7,3 cc. D'après ces chiffres, nous calculons que 17 % environ de tanin a été consommé pendant les 20 jours d'incubation. Ces données analytiques s'ajoutant aux observations macroscopiques et microscopiques nous permettent de conclure que la levure *Monilia* s'accommode difficilement d'un milieu ne contenant comme corps organique que du tanin, mais que, cependant, elle dégrade au moins partiellement la molécule de tanin.

Le genre *Monilia* constitue, à certains points de vue, un terme intermédiaire entre les moisissures et les levures ; dans nos essais *Monilia variabilis* se comporte comme une moisissure, elle détruit du tanin.

Nous constatons que cette dégradation du tanin ne donne pas naissance à des corps réducteurs. En effet,

s'il en était autrement, le pouvoir réducteur, après défécation, ne serait pas sensiblement nul.

3° Enfin, nous avons pu constater au cours de ces essais que la stérilisation n'a fait subir aucune hydrolyse au tanin, les pouvoirs réducteurs des milieux témoins nonensemencés après défécation étant négligeables ; nous pouvons en conclure qu'il n'y a pas eu hydrolyse du tanin pour donner naissance à des sucres réducteurs.

Influence de la teneur en tanin sur le développement de la levure « Monilia » :

Nous venons de voir que l'espèce *Monilia* est la seule capable de végéter dans un milieu de culture ne renfermant pour toute substance organique que du tanin. Dans ce qui va suivre, nous nous proposons d'étudier l'influence de différents teneurs en tanin sur la vitalité de ce microorganisme et, en particulier, de rechercher s'il n'existerait pas à ce point de vue une concentration optima en tanin dans le bouillon de culture.

Partant du milieu minéral qui a servi aux expériences précédentes, nous préparons quatre bouillons de culture renfermant respectivement 2 %, 4 %, 6 % et 8 % de tanin. Nous ensemençons des prises d'essais de 100 cc. de chacun de ces milieux, stérilisés, avec 1 cc. de culture de *Monilia* prélevée au cinquième jour de sa croissance et nous laissons en incubation pendant seize jours à une température comprise entre 20 et 22° C. La fermentation est alors arrêtée grâce à quelques gouttes d'une solution à 10 % de fluorure de sodium introduites dans le bouillon de culture, et nous procédons aux détermi-

nations quantitatives, telles que la mesure du pouvoir réducteur direct et total, et la mesure du pouvoir réducteur après défécation. Ces données numériques, de même que les observations résultant de l'examen macroscopique et microscopique des différents milieux sont consignées dans le tableau XXXII. (Voir tableau XXXII.)

Comme premier résultat, notons que l'acidité du milieu augmente avec la fermentation pour atteindre une valeur voisine de pH 3,6 quelle que soit la proportion de tanin contenue dans le milieu et son pH initial. Cette valeur de l'acidité en fin de fermentation semble donc dépendre surtout de la nature propre du microorganisme ensemencé.

En second lieu, nous pouvons constater que le pourcentage de tanin dégradé est d'autant plus élevé que le milieu de culture est lui-même moins riche en tanin. Mais si, d'autre part, on considère le tanin consommé en valeur absolue, on voit que c'est pour le milieu de culture à 8 % de tanin que ce chiffre est le plus élevé. Enfin, il semble d'après les données analytiques, que, quelles que soient les conditions de milieu, *Monilia* consomme une quantité de tanin sensiblement constante.

Lorsque la concentration en tanin atteint 16 %, on peut admettre que toute fermentation est suspendue et qu'à cette richesse en tanin la *Monilia variabilis* ne peut plus se développer.

3° Dans tous les cas, le pouvoir réducteur après défécation est pratiquement nul ; nous en déduisons que la dégradation du tanin n'a pas donné naissance à des produits réducteurs non défécables tels que les aldéhydes par exemple.

TABLEAU XXXII

ÉTUDE DE L'INFLUENCE DE DIFFÉRENTES PROPORTIONS DE TANIN SUR UNE CULTURE DE MONILIA VARIABILIS

Conditions expérimentales :

Volume de bouillon	100 cc.
Teneur en tanin	Variable.
Durée de l'incubation	15 jours.
Température	20-22° C.
Quantité de bouillon analysé	1 cm ³ .
Ensemencement effectué avec	1 cm ³ de culture.

Pourcentage de tanin contenu dans le milieu	pH du milieu		Pouvoir réducteur direct et total		Pouvoir réducteur après défécation		Proportion de tanin		EXAMEN MACROSCOPIQUE			EXAMEN MICROSCOPIQUE G = 300 diam.
	avant fermentation	après fermentation	exprimé en cm ³ de Mn O ⁴ K N/10 avant après fermentation	4	0,1	0	Consummé en tanin	exprimé en % par rapport au tanin initial	du dépôt végétatif	du voile	du milieu	
2%	4	3,75	4,4	4	0,1	0	0,0019	10	Peu abondant.	Presque inexistant.	Légèrement troublé.	Assez nombreuses ; forme lévurienne prédominante.
4%	3,8	3,60	8,8	8,4	0,1	0	0,0019	5	Un peu plus abondante.	Très léger.	Légèrement troublé.	Peu de cellules, également de forme lévurienne.
6%	3,75	3,55	13,3	13	0,1	0,05	0,0013	2,17	Très faible.	Inexistant.	Très légèrement troublé.	Très peu de cellules, exclusivement de forme lévurienne.
8%	3,70	3,60	17,7	17,2	0,1	0	0,00225	2,8	Très faible.	Inexistant.	Absolument clair.	De très rares cellules de forme lévurienne.
16%	3,50	3,50	35	34,8	0,15	0,1	0	0	Presque inexistant.	Inexistant.	Absolument clair.	Cellules extrêmement rares.

Les observations que nous venons de faire sur le pH du milieu indiquent plutôt que la dégradation du tanin par fermentation donne des composés acides.

A l'examen macroscopique des cultures, on se rend compte, comme précédemment, que *Monilia* s'accommode assez mal d'un milieu privé de sucre, mais qu'elle parvient néanmoins à s'y maintenir. L'absence de voile, la très faible importance du dépôt végétatif, indiquent que la reproduction des cellules est extrêmement ralentie.

L'examen microscopique nous a permis de constater à nouveau que la *Monilia* peut se présenter sous deux aspects différents correspondant soit à une forme mycélienne, soit à une forme levurienne. Cette dernière est celle qui apparaît lorsque le milieu est le moins favorable ; dans les essais en cours, il est intéressant de noter que le microorganisme se présente sous la forme levurienne alors que l'ensemencement a été fait avec une culture mycélienne. De plus, on remarque que les cellules deviennent moins nombreuses et de dimensions plus réduites au fur et à mesure que la teneur en tanin augmente dans le milieu de culture.

CHAPITRE IV

Action combinée du tanin et du sucre sur les cultures des Microorganismes des Jusées

Nous venons de voir que parmi les microorganismes des jusées, seule l'espèce *Monilia* était susceptible de croître dans un bouillon ne contenant que des matières minérales et du tanin pur. Nous avons montré d'autre part dans le second chapitre de cet exposé que les cultures de cette même *Monilia* et des trois espèces voisines sont très facilitées par la présence d'un sucre naturel, saccharose ou glucose. La fermentation des jus tannants industriels s'effectuant toujours dans des milieux de composition complexe et qui contiennent en particulier des matières sucrées en proportions variables, nous sommes naturellement conduits à rechercher dans quelle mesure ces dernières modifient l'action du tanin sur les microorganismes des jusées.

L'emploi du saccharose pouvant donner lieu à des phénomènes secondaires par suite d'une intervention toujours possible soit pendant la stérilisation en milieu acide, soit au cours de la fermentation elle-même, il nous

a paru préférable d'effectuer cette étude sur un bouillon glucosé dont voici la composition initiale :

Glucose	100 gr.
Chlorure de potassium.....	2 gr.
Chlorure de sodium.....	1 gr.
Silicate de soude.....	0 gr. 5
Sulfate d'ammoniaque	2 gr.
Chlorure de calcium.....	4 gr.
Sulfate de zinc.....	0 gr. 05
Sulfate ferreux	0 gr. 05
Eau Q. S.....	1000 cc.

Nous avons étudié l'action de chacune de nos levures sur des milieux renfermant respectivement 1 %, 2 %, 4 %, 8 % de tanin et sur un milieu exempt de tanin. Le mode opératoire a consisté à ensemercer des portions de 100 cc. de milieu stérile, avec 1 cc. de culture fraîche à son quatrième jour d'incubation. Chaque série était accompagnée d'essais témoins non ensemençés. L'examen quotidien des différents essais nous ayant permis de constater qu'après douze jours d'incubation toutes les fermentations étaient à peu près terminées, nous avons prolongé de trois jours encore la durée des expériences avant de les arrêter et de procéder aux déterminations d'ordre chimique et bactériologique.

Au point de vue chimique, nous avons relevé :
l'acidité des milieux, ou plus exactement son pH mesuré par la méthode électrométrique,
le pouvoir réducteur direct et total et le pouvoir réducteur après défécation, l'un et l'autre, avant et après fermentation, ceux-ci étant déterminés à l'aide de la méthode au permanganate de potasse précédemment décrite.

Dans un milieu ayant subi la fermentation, le pouvoir réducteur total représente la somme des pouvoirs réducteurs du glucose, du tanin, des autres constituants du milieu tels que les produits de la dégradation par voie biochimique ainsi que celui du sulfate ferreux qui pratiquement est négligeable et dont nous ne tiendrons pas compte dans cette étude.

Dans les essais témoins, le pouvoir réducteur direct et total se trouve rapporté au glucose et au tanin.

Le pouvoir réducteur après défécation à l'acétate plombeux représente, dans un milieu fermenté, le pouvoir réducteur du sucre et des produits de dégradation non défécables qui se sont formés éventuellement. Le pouvoir réducteur correspondant, dans un essai témoin, se rapporte uniquement au sucre ; le sulfate ferreux étant en quantité infinitésimale dans le milieu, nous pouvons pratiquement négliger la valeur de son pouvoir réducteur.

Ces différentes déterminations nous permettent de calculer :

a) *le pouvoir réducteur du tanin non dégradé*, différence entre le pouvoir direct et total d'un milieu fermenté et celui du même milieu après défécation.

b) *la proportion du tanin dégradé pendant la fermentation*, représentée par la différence entre le pouvoir réducteur du tanin non dégradé et le pouvoir réducteur du tanin primitivement incorporé au milieu.

Les conditions pratiques pour cette étude expérimentale et les résultats obtenus sont indiqués dans les tableaux XXXIII, XXXIV et XXXV. (Voir tableaux XXXIII, XXXIV, XXXV.)

TABLEAU XXXIII

ÉTUDE DE L'INFLUENCE DE DIFFÉRENTES PROPORTIONS DE TANIN SUR UNE CULTURE DE *MONILIA VARIABILIS*
EN PRÉSENCE DE GLUCOSE.

Conditions expérimentales :

Volume de bouillon	100 cc.
Teneur en glucose	10 %.
Teneur en tanin	Variable.
Durée de l'incubation	11 jours.
Température.....	20-22° C.
Quantité de bouillon analysé	1 cm ³ .
Ensemencement effectué avec	1 cm ³ de culture.

Pourcentage de tanin contenu dans le milieu	pH du milieu		Pouvoir réducteur direct et total		Pouvoir réducteur après défécation		Proportion de tanin		EXAMEN MACROSCOPIQUE			EXAMEN MICROSCOPIQUE G = 300 diam.
	avant fermentation	après fermentation	exprimé en cm ³ de Mn O ⁴ K N/10 avant après fermentation		exprimé en cm ³ de Mn O ⁴ K N/10 avant après fermentation		Consummé en tanin	exprimé en % par rapport au tanin initial	du dépôt végétatif	du voile	du milieu	
Exempt.	5,75	3,5	29,4	30,6	29,3	30,5			Léger dépôt	Léger.	Troublé.	Relativement peu de cellules.
1 %	4	3,85	31,5	33	29,3	29,2	0	0	Abondant	Plus léger que le précédent.	Très troublé.	D'assez nombreuses cellules des deux formes.
2 %	3,75	3,20	33,8	34,6	29,4	30,4	0,0019	10	Léger.	Inexistant.	Troublé.	Nombreuses cellules également des deux formes.
4 %	3,55	3,4	38,2	33,6	29,3	27	0,010	27,5	Léger.	Inexistant.	Peu troublé.	Peu de cellules, la forme levurienne prédomine.
8 %	3,50	3,5	47,1	48	29,4	30,8	0,010	12	Très léger.	Inexistant.	Transparent.	Seule la forme levurienne apparaît.

Les résultats du tableau XXXIII nous permettent de faire quelques constatations intéressantes en ce qui concerne *Monilia* :

1° L'acidité du milieu, en fin de fermentation, atteint toujours la même valeur pour une même espèceensemencée quelle que soit l'acidité initiale. Ce fait confirme les constatations qu'il nous avait été donné de faire précédemment dans l'étude du milieu.

2° Le pouvoir réducteur direct et total, après fermentation, est supérieur à celui des essais témoins ; cette particularité est due vraisemblablement à ce que certains hydrates de carbone sont dégradés en donnant naissance à des corps réducteurs.

En effet, nous constatons qu'après fermentation, le pouvoir réducteur direct et total est supérieur à celui des essais témoins.

3° C'est lorsque le milieu renferme 4 % de tanin que la proportion de tanin dégradé atteint son maximum.

Cela est encore une confirmation des constatations faites lors de l'étude de cette même levureensemencée dans un milieu exempt de sucre.

4° Le tanin est préjudiciable à la formation d'un voile.

Nous voyons, en effet, par le simple examen macroscopique en fin de fermentation, que le voile le plus important est obtenu en l'absence du tanin et qu'au fur et à mesure que la proportion de ce dernier croît dans le milieu, le voile devient de plus en plus faible, pour ne plus exister à partir de 4 % de tanin.

ÉTUDE DE L'INFLUENCE DE DIFFÉRENTES PROPORTIONS DE TANIN SUR UNE CULTURE DE SACCHAROMYCES
MARXIANUS EN PRÉSENCE DE GLUCOSE

Conditions expérimentales :

Volume de bouillon	100 cc.
Teneur en glucose	10 %.
Teneur en tanin	Variable.
Durée de l'incubation	15 jours.
Température	20-22° C.
Quantité de bouillon analysé	1 cm ³ .
Ensemencement effectué avec	1 cm ³ de culture.

Pourcentage de tanin contenu dans le milieu	pH du milieu		Pouvoir réducteur direct et total		Pouvoir réducteur après défécation		Proportion de tanin		EXAMEN MACROSCOPIQUE			EXAMEN MICROSCOPIQUE G = 300 diam.
	avant fermen- tation	après fermen- tation	exprimé en cm ³ de Min O ⁴ K N/10 avant après fermentation	exprimé en cm ³ de Min O ⁴ K N/10 avant après fermentation	exprimé en cm ³ de Min O ⁴ K N/10 avant après fermentation	exprimé en % par rapport au tanin initial	Consummé en tanin	Consummé en % par rapport au tanin initial	du dépôt végétatif	du voile	du milieu	
Exempt.	5,75	2,5	29,4	26	29,3	26			Léger.	Inexistant.	Peu troublé.	Peu de cellules.
1%	4	3,05	31,5	25	29,3	22,8	0	0	Assez abondant.	d°	Troublé.	d°
2%	3,75	3,05	33,8	29,4	24,6	24,6	0	0	d°	d°	d°	d°
4%	3,55	2,95	40	39,2	31,2	30,3	0	0	Très léger.	d°	Peu troublé.	d°
8%	3,50	3,45	47,1	47,4	31,4	30,6	0	0	Extrêmement faible.	d°	Limpide.	d°
16%	3,40	3,40	64,6	65	29,4	29,4	0	0	Inexistant	d°	Absolument limpide.	Peu de cellules, au- cune reproduction des cellules.

Il semble qu'on puisse donner à ce phénomène l'explication suivante :

Les voiles renferment souvent les mycéliums des micro-organismes végétant dans le milieu ; or, comme nous venons de le voir, le tanin introduit dans une culture de *Monilia* tend à faire disparaître la forme mycélienne de cette levure, pour la remplacer par la forme levurienne exempte de mycélium, donc de voile.

5° Le tanin favorise le développement de la forme levurienne au détriment de la forme mycélienne.

Nous avons déjà signalé ce phénomène lors de l'identification de nos levures.

Il est d'ailleurs certainement plus exact de dire que la forme levurienne du genre *Monilia* se rencontre chaque fois que cette levure se trouve dans des conditions de végétation défavorables et qu'au contraire, lorsque le milieu est très favorable, c'est la forme mycélienne qui apparaît avec ses longs filaments se désarticulant pour donner naissance à des arthrospores.

De ce qui précède, il résulte que le tanin, s'il n'est pas un antiseptique pour les levures, est tout au moins défavorable à leur développement.

Le tableau XXXIV se rapporte à l'étude du développement du *Saccharomyces* dans un milieu de culture renfermant du sucre et du tanin. (Voir tableau XXXIV.)

1° Comme pour la *Monilia*, on constate que l'acidité du milieu, en fin de fermentation, est toujours voisine d'une même valeur, propre au genre de levure ensemencée.

De plus le pH est de moins en moins acide au fur et à mesure que la concentration en tanin augmente ; lorsque cette dernière atteint 8 %, la fermentation est ralentie à tel point que l'acidité ne varie pas sensiblement et à 16 % de tanin elle est semblable avant et après fermentation.

2° Le tanin s'oppose au développement du *Saccharomyces* ; en effet :

l'acidité, comme nous venons de l'indiquer, varie en raison inverse de la teneur en tanin ;

avec 16 % de tanin, il semble que le milieu est non seulement défavorable, mais presque antiseptique ;

l'examen macroscopique, à lui seul, permet de se rendre compte de l'action néfaste du tanin ; en effet, le dépôt végétatif décroît d'autant plus qu'il y a plus de tanin dans le milieu. Quant au trouble, il diminue également ;

l'examen microscopique nous confirme, une fois de plus, les constatations précédentes ; il montre que les cellules sont très rares, quelques cellules mères seulement apparaissent à l'examen.

3° Le *Saccharomyces marxianus* ne peut attaquer la molécule de tanin.

4° Le *Saccharomyces marxianus* dégrade directement le glucose, en effet, les pouvoirs réducteurs directs et totaux des différents ballonsensemencés et fermentés sont très inférieurs aux pouvoirs réducteurs des ballons témoins correspondants.

5° La dégradation du glucose par le *Saccharomyces marxianus* ne donne pas naissance à des corps réducteurs ayant une faible masse moléculaire.

TABLEAU XXXV

ÉTUDE DE L'INFLUENCE DE DIFFÉRENTES PROPORTIONS DE TANIN SUR UNE CULTURE DE TORULA EN PRÉSENCE DE GLUCOSE.

Conditions expérimentales :

Volume de bouillon	100 cc.
Teneur en glucose	10 %.
Teneur en tanin	Variable.
Durée de l'incubation	18 jours.
Température	20-22° C.
Quantité de bouillon analysé	1 cm ³ .
Ensemencement effectué avec	1 cm ³ de culture.

Pourcentage de tanin contenu dans le milieu	pH du milieu		Pouvoir réducteur direct et total		Pouvoir réducteur après défection		Proportion de tanin		EXAMEN MACROSCOPIQUE			EXAMEN MICROSCOPIQUE G = 300 diam.
	avant fermentation	après fermentation	exprimé en cm ³ de Mn O ⁴ K N/10 avant après fermentation	exprimé en cm ³ de Mn O ⁴ K N/10 avant après fermentation	exprimé en cm ³ de Mn O ⁴ K N/10 avant après fermentation	exprimé en % par rapport au tanin initial	Consummé en tanin	exprimé en % par rapport au tanin initial	du dépôt végétatif	du voile	du milieu	
Exempt.	5,75	3,05	29,4	22,6	29,3	22,6			Léger.	Léger voile.	Troublé.	Quelques cellules. do
1%	4	3,1	31,5	31,2	29,3	28,4	0	0	Léger.	Voile plus léger que le précédent	Troublé.	
2%	3,75	3,2	33,8	33,2	29,4	28,2	0	0	Nettement plus abondant.	Intermédiaire entre les précédents plutôt des floés.	Troublé.	Rien de particulier.
4%	3,55	3,35	40	38,8	31,2	30,3	0	0	Semblable au précédent.	Ilôts blanchâtres.	Troublé.	do
8%	3,50	3,45	47,1	46,3	31,4	30,6	0	0	Léger dépôt.	Inexistant.	Peu troublé.	do
16%	3,40	3,40	64,6	64,5	29,4	29,3	0	0	Très léger.	Inexistant.	Transparent.	Les cellules n'ont pas bourgeonné.

6° Le *Saccharomyces marxianus* ne donne naissance à aucun voile quel que soit le milieu employé.

Pour la *Torula*, nous avons également effectué les mêmes recherches dont les observations se trouvent résumées dans le tableau XXXV ; elles nous permettent de conclure que :

1° L'acidité, en fin de fermentation, d'un milieuensemencé avec la *Torula* est toujours voisine de $\text{pH}=3,1$.

2° La *Torula* attaque directement le glucose et donne naissance à des produits très acides dont le pouvoir réducteur est inférieur à celui du glucose initial.

3° Le tanin est défavorable au développement de la *Torula* ; en effet, nous constatons que plus la proportion de tanin augmente, plus le pH des milieux fermentés se rapproche de celui des essais témoins.

Avec 1 % et 2 % de tanin, la fermentation semble extrêmement faible, la différence entre les pouvoirs réducteurs directs et totaux des essais ensemencés et ceux des témoins correspondants n'est que de 0,3 et 0,6 cc. de la liqueur permanganique.

4° Le tanin n'est pas dégradé par la *Torula* même en présence du glucose.

5° Le tanin favorise la formation du voile lorsqu'il existe à raison de 1 ou 2 % dans le milieu ; au delà de 2 %, le tanin est défavorable à la formation du voile qui devient de plus en plus léger et se transforme même en îlots.

Enfin, pour une teneur de 8 % en tanin, il ne se forme plus de voile.

Avec 16 % de tanin, il n'y a plus aucune fermentation.

6° L'examen macroscopique nous montre que l'activité de la fermentation n'est pas proportionnelle au volume du dépôt végétatif ; en effet, ce dernier est maximum lorsque les éléments organiques contenus dans le milieu sont peu dégradés, c'est le cas des essais contenant 1 et 2 % de tanin.

Au contraire, dans le milieu exempt de tanin, la fermentation semble plus complète, et le dépôt végétatif est très faible.

Enfin, une étude similaire nous a permis de mettre en évidence l'action du tanin sur le *Mycoderme* ; les résultats de cette étude sont consignés dans le tableau XXXVI, et interprétés dans les conclusions qui lui font suite. (Voir tableau XXXVI.)

1° Le *Mycoderme* n'attaque absolument pas la molécule de tanin, même en présence de glucose lorsque l'ensemencement n'est que de 1 cc. de culture.

Nous avons remarqué, en effet, que l'acidité du milieu est identique avant et après fermentation et que, d'autre part, la différence entre le pouvoir réducteur total et direct et le pouvoir réducteur après défécation correspond à un poids de tanin égal à celui qui est introduit initialement dans le milieu.

2° Le glucose est fortement attaqué et cela d'autant plus que la concentration en tanin est plus faible dans le milieu. On remarque en effet que dans l'essai exempt de tanin, l'acidité du milieu a considérablement augmenté ; elle est passée de 5,75 à 3,1. Ceci est dû probablement à ce que, par fermentation, le glucose a donné lieu à des produits de dégradation très acides.

ÉTUDE DE L'INFLUENCE DE DIFFÉRENTES PROPORTIONS DE TANIN SUR UNE CULTURE DE MYCODERME
EN PRÉSENCE DE GLUCOSE

Conditions expérimentales :

Volume de bouillon	100 cc.
Teneur en glucose	10 %.
Teneur en tanin	Variable.
Durée de l'incubation	15 jours.
Température	20-22° C.
Quantité de bouillon analysé	1 cm ³
Ensemencement effectué avec	1 cm ³ de culture.

Pourcentage de tanin contenu dans le milieu	pH du milieu		Pouvoir réducteur direct et total		Pouvoir réducteur après défécation		Proportion de tanin		EXAMEN MACROSCOPIQUE			EXAMEN MICROSCOPIQUE G = 300 diam.
	avant fermentation	après fermentation	exprimé en cm ³ de Mn O ⁴ K N/10 avant après fermentation		exprimé en cm ³ de Mn O ⁴ K N/10 avant après fermentation		Consummé en tanin	exprimé en % par rapport au tanin initial	du dépôt végétatif	du voile	du milieu	
Exempt.	5,75	3,1	29,4	30,8	20,3	29,5			Abondant	Épais, continu	Très trouble.	Nombreuses cellules.
1%	4	3,95	31,5	31,4	29,3	27,8	0	0	d°	d°	d°	d°
2%	3,75	3,70	33,8	31	29,4	26,4	0	0	d°	Moins épais que précédemment	d°	d°
4%	3,55	3,55	38,2	37,2	29,3	28,2	0	0	Plus faible.	Très léger.	Troublé.	Moins de cellules.
8%	3,50	3,50	47,1	44	29,4	27,6	0	0	Très faible	Inexistant.	d°	Très peu de cellules.
16%	3,40	3,40	64,6	64,6	29,4	29,3	0	0	Extrêmement faible.	d°	A peine trouble.	Très peu de cellules, culture ne semblant pas s'être reproduite.

A l'examen macroscopique, on remarque qu'il s'est formé un voile épais et continu.

Le pouvoir réducteur direct et total ayant augmenté, nous pouvons en conclure qu'il s'est formé des corps réducteurs de faible poids moléculaire.

3° Le tanin joue nettement le rôle d'un antiseptique vis-à-vis des *Mycodermes* ; il semble même qu'avec 8 % de tanin, il n'y a pas eu de fermentation et que le glucose contenu dans le milieu n'a pas été dégradé. A cette concentration, le tanin diminue et supprime même le voile que le genre *Mycoderme* donne ordinairement d'une façon très abondante.

L'étude de la dégradation du tanin par les microorganismes envisagés a été faite sur un milieu de composition artificielle ne renfermant pas d'autre composé organique que le sucre et dans lequel l'azote en particulier est introduit à l'état de sel minéral (sulfate d'Ammonium). Nous avons été conduit à adopter un tel milieu parce que le dosage du tanin en présence de composés organiques azotés et complexes s'est révélé pratiquement impossible. Malheureusement un tel milieu convient beaucoup moins bien à la culture de nos microorganismes que les milieux naturels, comme ceux à base d'eau de touraillons par exemple, de sorte que l'on peut se demander si nous aurions été amenés aux mêmes conclusions en utilisant des milieux dans lesquels la pousse est particulièrement active.

C'est pourquoi nous avons effectué les essais suivants dans lesquels nous avons étudié :

1° L'effet du tanin sur la croissance même de nos levures.

2° L'effet provoqué par l'introduction d'une dose massive de cellules microbiennes vivantes dans une solution renfermant du tanin, cette étude devant nous permettre d'estimer si ces cellules sont ou ne sont pas capables de détruire le tanin.

1° *Action du tanin sur la croissance des microorganismes :*

Pour cette étude, nous avons préparé un milieu à base de touraillons dans les conditions que nous indiquons page 81. Nous avons prélevé quatre prises d'essai de 100 cc., que nous avons respectivement additionnées de 2 %, 4 % et 8 % de tanin ; nous conservons la quatrième prise exempte de tanin. Ces 100 cc. de bouillon ont été stérilisés, puis ensemencés avec les trois souches : *Mycoderma*, *Torula* et *Saccharomyces*. Après dix jours d'incubation à la température de 20-22° C., nous avons centrifugé les milieux pour en séparer les colonies et nous avons pesé ces derniers à l'état humide. Les résultats obtenus figurent dans le tableau XXXVII.

On voit nettement que le tanin a une influence inhibitrice sur la croissance des trois espèces microbiennes étudiées.

Cette influence est déjà sensible à 2 % de tanin, elle est considérable pour la concentration de 8 %. L'action du tanin est particulièrement accusée dans le cas du *Saccharomyces*, puisque la pousse de ce dernier est pratiquement nulle dans un milieu à 8 % de tanin.

TABLEAU XXXVII

Conditions expérimentales :

Volume de bouillon à base d'eau de touraillons	100 cc.
Durée de l'incubation.....	10 jours.
Température.....	20-22° C.
Quantité de cultureensemencée.....	1 cm ³

Teneur en tanin	Poids de culture exprimé en milligrammes		
	Mycoderme	Torula	Saccharomyces
0%	765	942	191
2%	455	535	85
4%	153	175	50
8%	60	37	7

2° *Destruction éventuelle du tanin par les microorganismes.*

Ayant vérifié dans le paragraphe précédent que le tanin s'oppose au développement des levures, nous voulons rechercher d'autre part si, en procédant à un ensemencement massif de ces mêmes levures dans un milieu contenant du tanin, il est possible de dégrader plus ou moins profondément la molécule de ce composé.

Nous avons utilisé pour cette étude le milieu qui est décrit page 81 et qui contient de l'azote à l'état de sulfate d'ammoniaque. Dans deux séries d'expérience, nous avons utilisé, d'une part, un milieu à 4 %, d'autre part, un milieu à 4 % de tanin et 10 % de glucose. Dans chaque cas 100 cc. de milieu ont étéensemencés avec 1 gr. 5 de levures essorées humides obtenues préalablement par culture dans l'eau de touraillons. Nous réalisons ainsi un ensemencement très massif et nous pouvons observer l'effet produit sur le tanin sans qu'il soit nécessaire d'attendre que les levures se soient développées dans le

milieu contenant le tanin. Nous avons néanmoins prolongé l'incubation pendant dix jours avant de rechercher les modifications qui ont pu se produire. On sait que dans le milieu exempt de sucre, le pouvoir réducteur total représente directement la quantité de tanin mise en œuvre, tandis que dans le cas des bouillons qui renferment à la fois du tanin et du sucre, c'est la différence entre le pouvoir réducteur avant et après la défécation qui représente la richesse en tanin.

Les résultats sont exprimés dans le tableau XXXVIII.

TABLEAU XXXVIII

Conditions expérimentales :

Volume de bouillon	100 cc.
Durée de l'incubation	10 jours.
Température	20-22° C.
Ensemencement massif (poids de culture)	1 gr. 5

Nature de la levure	Pouvoir réducteur exprimé en cc. Mn OK ⁴ $\frac{N}{10}$					
	Milieu minéral + 4 % de tanin		Milieu minéral + 4 % tanin + 10 % de glucose			
			direct	total	après défécation	
	avant fermentation	après fermentation	avant fermentation	après fermentation	avant fermentation	après fermentation
	1	2	3	4	5	6
Mycoderme.	9,2	9,1	40	36	31,2	27
Torula.	9,2	9	40	36,7	31,2	28
Saccharomyces	9,2	8,95	40	33	31,2	24

Nous voyons, à l'examen de ces chiffres, que dans le mélange ne renfermant pas de glucose, le pouvoir réducteur est le même avant et après la fermentation. Il n'y a donc pas eu de tanin consommé dans ce cas.

Dans le cas où le milieu renferme du tanin et du glu-

cose, nous observons que la différence entre les chiffres des colonnes 3 et 5, d'une part, et 4 et 6, d'autre part, reste sensiblement constante. Or ce sont précisément ces chiffres qui représentent le pouvoir réducteur dû au tanin, et, par conséquent, la richesse tannique. Pour en faciliter l'interprétation, nous reproduisons ci-dessous ces différences :

Cas du <i>Saccharomyces</i> :	avant fermentation :	40	—	31,2	=	8,8
	après	—		33 — 24	=	9
Cas du <i>Mycoderme</i> :	avant fermentation :	40	—	31,2	=	8,8
	après	—		36 — 27	=	9
Cas de la <i>Torula</i> :	avant fermentation :	40	—	31,2	=	8,8
	après	—		36,7 — 28	=	8,7

Nous voyons donc que quelles que soient les conditions dans lesquelles nous nous plaçons, les espèces étudiées ne consomment pas de tanin. Nous pouvons donc affirmer qu'elles sont incapables de dégrader la molécule de tanin pyrogallique.

Rappelons que nous avons pu indiquer, d'autre part, que *Monilia variabilis*, qui à de nombreux points de vue se rapproche des moisissures, et qui pousse le mieux sur les milieux ne renfermant que de l'azote minéral, est capable d'hydrolyser le tanin.

CHAPITRE V

Produits engendrés par la fermentation du Glucose

Pour compléter cette étude de la fermentation des jus tannants, nous nous sommes proposé de déterminer quelles pouvaient être les modifications apportées à ces derniers par la croissance des espèces microbiennes étudiées dans les chapitres précédents.

Nous avons vu que ces espèces microbiennes ne vivent pas au dépens du tanin, mais qu'elles attaquent le glucose ; seule *Monilia variabilis* est capable de dédoubler le gallotanin en acide gallique et en glucose, et d'utiliser ultérieurement le glucose ainsi produit. Le pouvoir hydrolytique de cette moisissure vis-à-vis du tanin est d'ailleurs faible.

D'autre part, comme la croissance de ces espèces microbiennes est sensiblement ralentie par le tanin, et que la présence de ce dernier rend moins sûres les déterminations nécessaires après fermentation, nous avons observé l'effet de leur croissance sur des milieux renfermant du glucose et pas de tanin. Nous avons adopté le milieu de culture glucosé qui s'est révélé le meilleur pour la croissance des espèces envisagées (voir page 81).

Dans nos différents essais, des portions de 500 cc. de ce bouillon ont étéensemencées avec 1 cc. de culture fraîche et examinées par la suite comparativement à des témoins stériles nonensemencés.

Les fermentations ont duré dix-sept jours à 20-22° C. ; à ce moment, nous avons pu constater que la croissance des microorganismes, ainsi que les effets visibles des fermentations étaient, sinon annulés, du moins fortement ralentis. Nous avons filtré sur papier Chardin, lavé le filtre et complété à 1.000 cc. avec les eaux de lavage.

Il nous a été facile de constater, tout d'abord, que le bouillon, après fermentation, renfermait des produits acides, de l'alcool et des éthers. En particulier, la présence d'acétate d'éthyle se décelait nettement par son odeur forte et caractéristique. D'autre part, en procédant à la distillation fractionnée d'une partie aliquote du liquide, nous avons pu noter deux paliers de température : l'un à 75° C., correspondant à la distillation de l'acétate d'éthyle, l'autre à 80° C., correspondant au passage des vapeurs d'alcool.

Il était donc tout naturel de compléter l'étude de la composition du milieu fermenté au moyen des déterminations suivantes :

Dosage de l'acidité totale
— du glucose
— de l'acidité volatile
— des éthers
— de l'acidité fixée

Dosage de l'acidité totale :

Elle a été déterminée par simple titrage au moyen de soude N/10 en présence de phénolphtaléine.

Dosage du glucose :

Il a été effectué selon la méthode bien connue de BERTRAND et THOMAS.

Dosage de l'acidité volatile :

Nous distillons; tout d'abord, 200 cc. de bouillon fermenté, de façon à recueillir 100 cc. de distillat. Nous ajoutons alors 100 cc. d'eau distillée dans le ballon et nous distillons à nouveau 100 cc. que nous joignons au premier distillat. Nous avons soin de vérifier qu'à la fin de cette seconde distillation, les dernières gouttes sont absolument neutres. Le distillat est enfin titré par la soude N/10 en présence de phénolphtaléine. Nous obtenons ainsi l'acidité volatile que nous pouvons exprimer en milligrammes d'acide acétique pour 100 cc. de bouillon initial.

Dosage des éthers :

Notre méthode de dosage a consisté à saponifier 25 cc. de distillat par de la soude N/10. Afin de nous assurer que la saponification était totale dans les conditions où nous opérons, nous avons fait différents essais sur des solutions aqueuses contenant un poids exactement connu d'acétate d'éthyle et voisin de 25 milligrammes pour 100 cc. Ces différents essais nous ont montré qu'il n'y avait pas lieu de tenir compte d'un correctif puisque la saponification était totale. On peut donc admettre comme exact l'indice d'éther trouvé. Pratiquement, nous opérons une prise d'essai que nous neutralisons très exactement à froid, puis nous lui ajoutons 20 cc. d'une solution déci-normale de

soude et nous faisons bouillir pendant une heure sous un réfrigérant à reflux. Après refroidissement, nous ajoutons 20 cc. d'acide sulfurique N/10 et nous titrons en retour par la soude N/10. Cette dernière titre l'acidité qui a pris naissance par suite de l'hydrolyse des éthers sels.

Les résultats de cette saponification quantitative sont exprimés en milligrammes d'acétate d'éthyle par 100 cc. de bouillon primitif.

Dosage de l'acidité fixe :

L'acidité fixe a été dosée dans la liqueur résiduaire de la distillation par titrage à la soude déci-normale en présence de phénolphthaléine. Les résultats ont été exprimés en milligrammes d'acide lactique par 100 cc. de bouillon.

On a reconnu qualitativement la présence d'alcool dans le distillat.

L'ensemble des résultats concernant l'étude des produits engendrés par la fermentation du glucose est exposé dans le tableau XXXIX ci-après.

Parmi les quatre espèces étudiées ci-dessus, seul *Saccharomyces marxianus* fournit des quantités appréciables d'alcool. Cette espèce ne donne que des traces d'acides fixes ou volatiles ; elle fournit des quantités appréciables d'éthers.

L'acidité totale la plus élevée est donnée par *Monilia variabilis* ; cette acidité consiste principalement en acides fixes. Le liquide fermenté renferme, en outre, une quantité assez importante d'éthers.

La *Torula* provoque également une acidification assez importante du bouillon qui est constituée principalement

TABLEAU XXXIX

Conditions expérimentales :

Volume de bouillon glucosé	500 cc.
Volume de cultureensemencée.....	1 cc.
Durée d'incubation	17 jours.
Température.....	20-22° C.

NOMS des espèces	LIQUIDE AVANT FERMENTATION				LIQUIDE APRÈS FERMENTATION				
	m/m gr. de glucose % cc. de bouillon.	ACIDITÉ TOTALE exprimée en cc. de NaOH N/10 % cc. de bouillon.	ACIDITÉ FIXE calculée en m/m gr. d'acide lactique % cc. de bouillon.	ACIDITÉ VOLATILE calculée en m/m gr. d'acide acétique % cc. de bouillon.	m/m gr. de glucose % cc. de bouillon.	ACIDITÉ TOTALE exprimée en cc. de NaOH N/10 % cc. de bouillon.	ACIDITÉ FIXE calculée en m/m gr. d'acide lactique % cc. de bouillon.	ACIDITÉ VOLATILE calculée en m/m gr. d'acide acétique % cc. de bouillon.	ÉTHERS en m/m gr. d'acétate d'éthyle % cc. de bouillon.
Monilia.	7200	16	14,4	nulle	4400	34	27	2,4	20,4
Torula.	7200	16	14,4	d ^o	4840	32	24,3	3	21,12
Mycoderme.	7200	16	14,4	d ^o	4760	25	18,9	2,4	9,14
Saccharomyces.	7200	16	14,4	d ^o	76	18	16,2	traces	27,44

par des acides fixes ; elle fournit aussi une proportion d'éthers assez importante.

Le *Mycoderme* ne produit qu'une faible augmentation de l'acidité du bouillon ; il fournit peu d'éthers ; il est vraisemblable que la majeure partie du sucre qui disparaît par suite de sa croissance est complètement brûlée et transformée en eau et en gaz carbonique.

La disparition du sucre a été complète dans le cas de la culture du *Saccharomyces* ; elle n'a été que partielle dans le cas des autres espèces.

On peut donc supposer que dans les jus tannants, les espèces à forme levurienne que nous avons étudiées contribuent à la formation de l'acidité ; à ce point de vue, ce sont les *Torula* et les *Monilia* qui sont les plus actives. Le *Saccharomyces* produit de l'alcool qui peut fermenter ultérieurement sous l'influence des bactéries acétiques. Quant aux *Mycodermes*, ils consomment purement et simplement le sucre sans donner de produits utiles.

Si nous envisageons les avantages ou les inconvénients que peut présenter le développement de ces microorganismes dans les jus tannants, nous pouvons conclure que :

L'utilité de *Monilia variabilis*, *Torula* et *Mycoderme* est assez faible car, même les deux premières qui développent au mieux l'acidité nécessaire au tannage, ne le font qu'avec un assez mauvais rendement. D'autre part, les *Mycodermes* dont il ne paraît guère possible d'éviter la croissance tout en favorisant celle des autres espèces, consomment purement et simplement du sucre sans produire d'acidité.

Les inconvénients du développement des *Monilia*, *Torula* et *Mycoderme* ne sont pas considérables car, à l'exception toutefois de *Monilia variabilis*, ces espèces microbiennes ne consomment pas de tanin. *Monilia variabilis* n'est pas une grande destructrice de tanin et ne peut être, à ce point de vue, comparée aux moisissures typiques.

Le *Saccharomyces* peut avoir le rôle le plus utile car il provoque une certaine acidité et la formation d'alcool susceptible de fermenter ultérieurement pour donner de l'acide acétique.

D'une façon générale, nous pouvons conclure que les microorganismes à forme levurienne qui envahissent la surface des jus tannants en formant des voiles, et parmi lesquels nous avons identifié les genres *Monilia*, *Torula* et *Mycoderma*, ne sont pas très nuisibles, mais sont, néanmoins, plus nuisibles qu'utiles, que le genre *Saccharomyces* qui se développe de préférence en anaérobiose, au fond des cuves, joue un rôle utile.

CONCLUSIONS

L'étude des microorganismes végétant sur les jus tan-nants nous a permis d'isoler quatre espèces de levures présentant des caractères nettement différents, à savoir :

le *Saccharomyces marxianus*,
une *Torula*,
un *Mycoderme*,
la *Monilia variabilis*.

Les trois dernières espèces forment un voile levurien à la surface des jus ; la première, au contraire, pousse de préférence en profondeur et détermine dans les jus ren-fermant un peu de sucre, une véritable fermentation alcoolique, ce qui nous permet de dire que seul le *Saccha-romyces marxianus* est une levure vraie.

Nous avons étudié et indiqué, au cours de cette étude, les caractères morphologiques de ces microorganismes.

Nous avons noté aussi l'influence de la nature des sucres contenus dans le milieu. C'est ainsi que nous avons obtenu les pousses les plus abondantes avec le sac-charose, lorsqu'il s'agissait de la *Monilia*, de la *Torula* et du *Mycoderme*. Par contre, le *Saccharomyces* pousse mieux sur les milieux renfermant du glucose. Enfin, pour les trois premières espèces, le saccharose non inter-verti est plus favorable qu'un mélange équimoléculaire de fructose et de glucose.

Si le milieu renferme de petites quantités de fer, sous forme de tannate noir, nos levures, et la *Monilia* en particulier, fixent ce fer, et la teinte du jus s'éclaircit. Si ce métal est en faible proportion, il disparaît totalement ; mais si l'on incinère la levure, il réapparaît dans les cendres.

Pour les besoins de notre étude, nous avons été amené à étudier les meilleures conditions de développement de chacun de ces microorganismes et, par conséquent, à noter l'influence de la composition du milieu de culture sur le poids des colonies obtenues.

Nous avons remarqué que les différents anions ou cations introduits dans le milieu de culture avaient des influences très diverses : le zinc est favorable à la *Torula*, alors que le manganèse et les anions nitriques et phosphoriques lui sont néfastes. Au contraire, la plupart des éléments étudiés sont favorables au *Saccharomyces*, depuis l'anion nitrique, phosphorique, les cations magnésium et calcium jusqu'au fer, au zinc, et au manganèse. La *Monilia* s'accorde mal avec ce dernier cation, ainsi qu'avec les anions nitriques et phosphoriques, alors qu'au contraire, le fer, le zinc lui sont favorables. Quant au *Mycoderme*, les métaux lourds et le manganèse en particulier lui sont indispensables ainsi que l'anion phosphorique et le calcium.

L'azote est, d'une façon générale, favorable à nos microorganismes. Cependant cette action est beaucoup moins accusée, lorsque le milieu contient uniquement des sels ammoniacaux. En ce cas, bien que les pousses soient faibles, nous avons pu néanmoins utiliser ce milieu pour étudier la dégradation du tanin.

Les milieux renfermant de la maltopeptone donnent, par contre, une pousse beaucoup plus active, encore qu'à quantité d'azote égale, elle soit moins bonne que lorsque cet élément est remplacé par une décoction de touraillons.

Nous avons également étudié l'influence de l'introduction dans le milieu, de différents acides aminés. Avec aucun de ces acides, nous n'avons obtenu des pousses aussi importantes qu'avec la maltopeptone ou l'eau de touraillons ; nous en déduisons que : ou bien nos levures s'accommodent mieux d'un mélange complexe d'acides aminés, ou bien que les milieux naturels renferment des substances qui catalysent leur développement.

Avec certains acides aminés, aucune pousse ne s'est produite ; ce sont : la tyrosine et la pipérazine.

Lorsque le développement de nos levures se produit sur un milieu renfermant de l'azote sous la forme d'un acide aminé déterminé, la pousse est d'autant plus active, à quantité d'azote égale, que la chaîne hydrocarbonée de l'acide aminé est plus longue.

A quantité d'azote égale, la *Torula* se développe mieux sur un milieu renfermant un acide aminé bi-basique ; d'autre part, les acides aspartique et anthranilique sont les plus favorables parmi les acides aminés étudiés.

Le *Saccharomyces* et la *Monilia* préfèrent l'alamine, l'acide anthranilique et l'asparagine.

Pour le *Mycoderme*, ce sont l'asparagine et le glycolle qui présentent l'action la plus favorable.

Nous avons pu ainsi, pour chacune de nos espèces, établir un milieu qui nous donne un développement maximum du microorganisme envisagé.

Enfin, nous avons établi également un milieu standard, permettant d'obtenir avec nos quatre levures de très bons résultats.

La présence de tanin dans le milieu de culture est toujours plus ou moins défavorable ; cependant, ces levures peuvent en supporter des doses relativement élevées. Nous avons pu constater que la *Monilia variabilis* poussait encore avec 8 % de tanin ajouté au milieu sucré utilisé pour la culture normale sans tanin.

Par contre, si l'on supprime le sucre, le tanin étant conservé ainsi que tous les autres éléments du milieu normal, le *Saccharomyces*, le *Mycoderme* et la *Torula* ne poussent pas, et, par conséquent, la richesse tannique du milieu n'est pas modifiée.

Mais, dans les mêmes conditions, *Monilia variabilis* se développe aux dépens du tanin ; il faut cependant constater que le tanin sans sucre ne lui est pas particulièrement favorable ; elle s'y développe mal, sans donner de voile, et apparaît alors sous sa forme de résistance, c'est-à-dire sous sa forme levurienne. Au contraire, sur les milieux qui lui sont favorables, elle reprend sa forme mycélienne caractéristique.

Lorsque le tanin est ajouté au milieu sucré et que, par conséquent, nous nous trouvons dans des conditions telles que toutes nos espèces se développent encore de façon appréciable, nous constatons, pour la *Monilia* seulement, la disparition d'une certaine quantité de tanin qui a été utilisé vraisemblablement pour le développement de cette levure. La consommation en tanin est la plus forte lorsque ce dernier est à une concentration de 4 % dans le bouillon ; elle atteint alors 27,5 %. Quant aux autres

levures, elles n'attaquent absolument pas le tanin que l'on retrouve intégralement après la fermentation.

Nous voyons, par ce qui précède, que nos quatre levures poussent en présence du tanin si le milieu est glucosé ; mais, seule, *Monilia variabilis* le décompose, ce qui nous amène à dire que c'est l'espèce qui se rapproche le plus des moisissures pour lesquelles le tanin est un élément normal de vie.

Quant à l'acidification produite dans les jus tannants au cours du développement de ces levures, nous avons pu constater que chacune de ces espèces amène le jus à une valeur de pH bien déterminée, à la condition toutefois qu'elle trouve dans le milieu une quantité suffisante d'éléments sucrés.

Cette valeur de pH est voisine de :

pH = 2,9	pour la <i>Monilia variabilis</i>
pH = 2,4	— le <i>Saccharomyces marxianus</i>
pH = 2,6	— la <i>Torula</i>
pH = 3,2	— le <i>Mycoderme</i>

Remarquons que ce sont le *Saccharomyces marxianus* et la *Torula* qui donnent l'acidification maximum.

En ce qui concerne la nature de l'acidité produite nous avons noté et dosé des acides volatils (acide acétique) et des acides fixes et enfin nous avons constaté la production d'éther acétique.

Si nous nous plaçons au point de vue technique, nous pouvons noter que ces microorganismes peuvent jouer un rôle utile par acidification des jus et que la production d'acide acétique n'est pas uniquement le fait des bactéries acétiques transformant l'alcool produit par les

levures. La *Torula* et la *Monilia* ont une action indirecte, l'acidification provenant en effet dans ce dernier cas de la forte production d'alcool, lequel est susceptible d'être oxydé ultérieurement par les bactéries acétiques.

Par contre, si la *Monilia variabilis* est utile au point de vue de l'acidification du milieu, elle est nuisible d'autre part, puisqu'elle est susceptible de consommer du tanin ; toutefois, à ce point de vue, elle est loin d'avoir l'influence nuisible des véritables moisissures qui le détruisent beaucoup plus rapidement.

Quant au *Mycoderme*, il ne fournit aucun produit utile, consommant seulement le sucre contenu dans le milieu.

Notons que ces levures ne secrètent pas de pigments noirs ou brunâtres comme le font certaines moisissures, en particulier les *Aspergillés* et les *Pénicillés*, et que, par conséquent, elles n'altèrent pas la coloration des jus.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	9
PREMIÈRE PARTIE	
Historique et exposé bibliographique	15
DEUXIÈME PARTIE	
CHAPITRE PREMIER. — <i>Séparation et caractérisation de levures ou autres microorganismes à forme levurienne végétant sur les jus tannants</i>	27
Monographie des microorganismes de la fermentation du jus tannant : Quebracho-Châtaignier	32
Monographie des microorganismes de la fermentation du jus tannant : Myrobolam-Sumac..	37
CHAPITRE II. — <i>Influence de la composition du milieu sur le développement des microorganismes</i>	40
CHAPITRE III. — <i>Action du tanin sur les microorganismes des jusées</i>	84
CHAPITRE IV. — <i>Action combinée du tanin et du sucre sur les cultures des microorganismes des jusées..</i>	104
CHAPITRE V. — <i>Produits engendrés par la fermentation du glucose</i>	121
CONCLUSIONS	129

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITION DONNÉE PAR LA FACULTÉ

CAOUTCHOUCS SYNTHÉTIQUES ET FACTICES

Lu et accepté :

Vu et approuvé :

LES MEMBRES DU JURY,

LE DOYEN DE LA FACULTÉ
DES SCIENCES DE LYON,

MEUNIER.

VANEY.

DOUIN.

CHAMBARD.

Vu et permis d'imprimer :

LYON, le 5 juin 1939.

DOUIN.

LE RECTEUR, PRÉSIDENT DU CONSEIL DE L'UNIVERSITÉ,

POUR LE RECTEUR ET PAR DÉLÉGATION :

Le Vice-Président du Conseil de l'Université,

DOUIN.

TYPOGRAPHIE DE
NOIRCLERC & FÉNÉTRIER
MAITRES-IMPRIMEURS
A LYON

